



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>

UC-NRLF



B 3 481 480



THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA

EMIL FISCHER COLLECTION

PRESENTED BY HIS SON

Prof. Hermann Fischer
Basel
Rothemannstr. 22

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. F. HOFMEISTER in Strassburg, Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Prof. E. LUDWIG in Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. C. A. PEKELHARING in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Marburg.

SIEBENUNDZWANZIGSTER BAND.

Mit einer lithographischen Tafel und vier Abbildungen.

STRASSBURG
VERLAG VON KARL J. TRÜBNER
1899.

Chemistry Lib.

QP501

H7

v. 27-28

~~CHEMISTRY~~
~~LIBRARY~~
 BIOCHEM.
 LIBRARY

Inhalt des siebenundzwanzigsten Bandes.

HEFT I und II.

(Ausgegeben am 25. März 1899.)

Seite

Wörner, Emil. Beiträge zur Kenntniss des Kreatinins	1
Oswald, Ad. Die Eiweisskörper der Schilddrüse	14
Gulewitsch, Wl. Ueber die Leukomatine des Ochsengehirns . . .	50
Jolles, Adolf. Beiträge zur qualitativen und quantitativen Gallenfarbstoff-Bestimmung im Harn	83
Hausmann, Walther. Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül	95
Ruppel, Dr. W. G., und Dr. F. Ransom. Ueber Molekularverhältnisse von Tetanussgiftlösungen. I. Mittheilung	109
Pröschner, Fr. Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls	114
Neuberg, Carl. Ueber die quantitative Bestimmung des Phenols im Harn	123
Wang, Eyvin. Weiteres über die quantitative Bestimmung des Harnindikans	135
Czapek, Friedrich. Ueber die sogenannten Ligninreactionen des Holzes	141

HEFT III.

(Ausgegeben am 10. Mai 1899.)

Fabian, Dr. Edmund. Ueber das Verhalten des salzsauren Glycosamins im Thierkörper	167
Gulewitsch, Wl. Ueber das Arginin	178
Weiss, Dr. med. J. Weitere Beiträge zur Erforschung der Bedingungen der Harnsäurebildung	216
Zanz, Dr. E. Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte mittelst Zinksulfat	219
Schulz, Fr. N., und O. Falk. Phosphorsäureausscheidung nach Castration	250
Zuelzer, Dr. G. Ueber Darstellung von Lecithin und anderen Myelinsubstanzen aus Gehirn- und Eigelbextracten	255

M643300

HEFT IV und V.

(Ausgegeben am 24. Juni 1899.)

Seite

Schulze, E. Ueber die Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen, über seine physiologische Rolle und über lösliche Kohlenhydrate, die ihn begleiten. Zweite Abhandlung . . .	267
Gulewitsch, Wl. Ueber das Thymin. Mit einer Tafel . . .	292
Salkowski, E. Kleinere Mittheilungen . . .	297
Nebelthau, E. Beitrag zur Lehre vom Hämatoporphyrin des Harns	324
Siegfried, M. Ueber Antipepton. I. Mittheilung . . .	335
Bouma, Jac. Ueber die quantitative Bestimmung des Harnindicans nach Wang-Obermayer . . .	348
Abderhalden, Emil. Die Beziehungen der Zusammensetzung der Asche des Säuglings zu derjenigen der Asche der Milch beim Meerschweinchen . . .	356
Gulewitsch, Wl. Nachtrag zu meiner Mittheilung über das Arginin	368
Noll, A. Ueber die quantitativen Beziehungen des Protogons zum Nervenmark . . .	370
Petry, Eugen. Ein Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste . .	398
Abderhalden, Emil. Die Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch beim Hunde, beim Schwein, beim Schaf, bei der Ziege und beim Meerschweinchen . . .	408

HEFT VI.

(Ausgegeben am 18. Juli 1899.)

Bang, Ivar. Studien über Histon . . .	463
Nencki, M., und J. Zaleski. Ueber das Verhalten des Benzoyl- und des Calciumsuperoxyds im Verdauungskanal des Menschen und des Hundes . . .	487
Salkowski, E. Ueber das Vorkommen von Pentosen im Harn . .	507
Gulewitsch, Wl. Ueber das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen . . .	540
Wang, Eyviu. Fütterungsversuche im Indol . . .	557
Wichmann, Arthur. Ueber die Krystallformen der Albumine. Mit vier Abbildungen . . .	575
Abderhalden, E. Zurechtstellung . . .	594

Beiträge zur Kenntniss des Kreatinins.

Von
Emil Wörner.

(Aus der chem. Abtheilung des physiolog. Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 2. Februar 1899.)

Vor einigen Jahren veröffentlichte G. St. Johnson¹⁾ mehrere Abhandlungen über Kreatin und Kreatinin und deren Vorkommen im Muskel und Harn, in denen er nachzuweisen versuchte, dass die aus Harn, Muskel oder Kreatin erhaltenen Kreatinine verschiedene Isomere darstellen, welche durch geeignete Bedingungen in einander übergeführt werden können; er stützte diese Behauptung durch Unterschiede in der Löslichkeit, Krystallform, Krystallwassergehalt, Reduktionsvermögen und namentlich durch Verschiedenheiten im Verhalten der Gold- und Platindoppelsalze dieser Kreatinine verschiedenen Ursprungs. Diese Ergebnisse fanden allerdings keinen ungetheilten Glauben, da manche der Johnson'schen Versuche nicht ganz einwandfrei erschienen.

Einer gütigen Anregung von Herrn Prof. Thierfelder Folge gebend, unternahm ich es daher, die Angaben Johnson's einer Nachprüfung zu unterziehen, wobei ich durch Herrn Dr. M. Thelen in dankenswerther Weise unterstützt wurde.

Während ich mit dem Abschluss dieser Versuche, die leider durch äussere Umstände mehrfache Unterbrechungen

1) *Proced. of the roy. Soc.* **42**, 365, **43**, 493—534, **50**, 287—302.

erleiden mussten, beschäftigt war, kam mir erst eine Arbeit von Toppelius und Pommerehne¹⁾ zu Gesicht, welche denselben Gegenstand behandelte.²⁾

Diese Autoren verwandten zu ihren vergleichenden Versuchen Kreatinin aus Harn und Fleischextract, und Kreatinin aus Harnkreatin und synthetischem Kreatin, während ich Harn- und Fleischextractkreatinin und Kreatinin aus Harn-, Muskel- und Fleischextractkreatin zum Vergleich heranzog, im wesentlichen dieselben Präparate, die auch Johnson in den Bereich seiner Untersuchungen zog.

Johnson bediente sich zur Abscheidung des Kreatinins aus dem Harn nach dem Vorschlage von Maly³⁾ des Quecksilberchlorids. Er versetzte den frischen Harn mit $\frac{1}{5}$ seines Volumens kalt gesättigter Natriumacetatlösung und $\frac{1}{4}$ Volumen kalt gesättigter Quecksilberchloridlösung und filtrirte den sofort auftretenden Niederschlag rasch ab. Nach kurzer Zeit beginnt dann die Abscheidung einer feinkörnigen kugeligen Quecksilberchloriddoppelverbindung des Kreatinins; in Form dieses Niederschlags soll nach 48 Stunden alles Kreatinin ausgefällt sein. Dies ist aber in der That nicht der Fall, wie schon Huppert⁴⁾ gelegentlich beobachtet hat. Ein weiterer Zusatz von Natriumacetat und Quecksilberchlorid bewirkt erneut eine Fällung. Zur völligen Abscheidung des Kreatinins sind erheblich grössere Mengen von Quecksilberchlorid nöthig.

Der Niederschlag stellt auch durchaus kein reines Kreatininquecksilberchloriddoppelsalz dar, wie das Johnson annimmt, der direkt vorschlägt, aus der Menge desselben die

1) Arch. f. Pharm. 234, 380—97.

2) Herr Prof. Schmidt, Marburg, gibt in einer kleinen Abhandlung (Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiolog. Abth. 98, 373) kurz den Inhalt dieser Arbeit nochmals wieder, da ich es in einem kurzen vorläufigen Referat (Verhandl. der physiolog. Ges. zu Berlin 97/98, 25, obiges Archiv 98, 266) über diesen Gegenstand durch ein Versehen unterlassen hatte, die genannte Arbeit anzuführen, obwohl ich bei dem Vortrag selbst auf dieselbe Bezug genommen hatte.

3) Liebig's Ann. 159, 279.

4) Anl. z. Analyse d. Harns v. Neubauer u. Vogel, 9. Aufl., bearb. v. Huppert, pag. 236.

Kreatinmenge zu berechnen, sondern er enthält noch andere stickstoffhaltige Substanzen, über welche ich in Bälde Weiteres berichten zu können hoffe.¹⁾

Die Quecksilberfällung zersetzte Johnson mit Schwefelwasserstoff, filtrirte und verdunstete zur Krystallisation. Dabei schieden sich aus den Harnpräparaten immer wasserfreie Blättchen von salzsaurem Kreatinin ab, während aus Fleisch unter diesen Umständen Blättchen mit einem Molekül Krystallwasser erhalten wurden. Entfernte er aus den Lösungen der so erhaltenen Chloride die Salzsäure durch Behandeln mit frischgefälltem Bleihydroxyd in der Kälte — in der Wärme bildet sich reichlich Kreatin —, so erhielt er, je nachdem er das Eindampfen der Lösungen im Vacuum bei 60° oder 100° vornahm, Kreatininkrystalle von verschiedenem Aussehen (effloresc. Kr., tabulair Kr. α , tabulair Kr. β), die bald wasserfrei, bald wasserhaltig waren und durch Erhitzen ihrer wässerigen Lösungen auf 60° und Verdunsten bei der entsprechenden Temperatur in einander übergeführt werden konnten. Hiervon ist soviel richtig, dass sowohl das freie Kreatinin wie das salzsaure Salz mit und ohne Krystallwasser und in verschiedenen Formen zu krystallisiren vermögen.

Lässt man eine kaltgesättigte Lösung von salzsaurem Kreatinin langsam an der Luft verdunsten, so erhält man Krystalle, welche 1 Molekül Krystallwasser enthalten, während aus heissen Lösungen, besonders wenn sie noch freie Salzsäure enthalten, stets wasserfreie Krystalle erhalten werden, wie dies auch Toppelius und Pommerehne²⁾ festgestellt haben. Dieser Wassergehalt wurde sowohl durch Bestimmung

1) Kolisch (Centralblatt für inn. Med. 95, 265—269) hat auf die von Johnson angewandte Fällungsmethode eine quantitative Bestimmung des Kreatinins gegründet, indem er den analog von Neubauer erhaltenen phosphatfreien alkoholischen Harnauszug mit einer essigsäuren alkoholischen Sublimatlösung und Natriumacetat ausfällte und aus dem N-Gehalt des Niederschlags das Kreatinin berechnete. Diese Methode bietet noch viel weniger Garantie für eine reine Kreatininfällung und muss als völlig unbrauchbar verworfen werden.

2) l. c.

des Gewichtsverlustes bei 100°, wie durch Bestimmung des N-Gehaltes der wasserhaltigen Substanz nach Kjeldahl nachgewiesen.

I. Salzsaures Harnkreatinin:

0,091 Substanz lieferten 0,0238 N = 26,15 %
 0,53 „ verloren 0,0541 H₂O = 10,20 %.

II. Salzsaures Fleischkreatinin:

0,199 Substanz lieferten 0,0525 N = 26,38 %
 0,3201 „ verloren 0,0337 H₂O = 10,52 %.

Berechnet für:	Gefunden:	
C ₄ H ₇ N ₃ OHCl + H ₂ O	H. — Kr.	F. — Kr.
N = 25,74 %	26,15 %	26,38 %
H ₂ O = 10,74 %	10,20 %	10,52 %

Ueberlässt man kaltgesättigte wässrige Kreatininlösungen der freiwilligen Verdunstung, so scheiden sich sehr häufig grosse Tafeln oder Prismen mit 2 Molekülen Krystallwasser ab,¹⁾ während aus heiss gesättigten Lösungen stets wasserfreie Blättchen anschliessen. Die wasserhaltigen Krystalle verwittern ungemein leicht.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden die schönsten Krystalle aus der Mutterlauge herausgefischt, durch Zerreiben zwischen Filtrirpapier getrocknet, dann sofort abgewogen und bei 100° zur Gewichtsconstanz gebracht.

0,302 H. — Kr. verloren	0,071 H ₂ O	= 23,50 %
0,241 F. — Kr. „	0,0568 „	= 23,56 %.
Berechnet für:	Gefunden:	
C ₄ H ₇ N ₃ O + 2H ₂ O	H. Kr. — F. — Kr.	
H ₂ O = 24,16 %.	23,50 %	23,56 %.

Die von Johnson bei seinen verschiedenen Kreatininen beobachteten Differenzen in der Löslichkeit in Wasser (1: 10,6 bei 14°, 1: 10,78 bei 17°, 1: 10,68 bei 16,5°) sind derartig gering, dass aus ihnen ernstlich wohl nur die Identität, aber keine Verschiedenheit gefolgert werden kann. Die Löslichkeit in Alkohol haben Toppelius und Pommerehne²⁾ nachgeprüft und auch dabei keine erheblichen Unterschiede gefunden.

¹⁾ In Neubauer-Vogel, Analyse des Harns etc., 10. Aufl., b. von Huppert, ist irrthümlicherweise 2 1/2 Moleküle angegeben.

²⁾ l. c.

Die Platindoppelsalze.

Die aus den verschiedenen salzsauren Kreatininen erhaltenen Platinchloriddoppelsalze waren völlig identisch. Sie schieden sich aus heissen wässerigen Lösungen in gelbrothen Säulchen mit 2 Molekülen Krystallwasser ab. Aus alkoholischen Lösungen erhält man wasserfreie Krystalle. Das wasserfreie Salz schmilzt bei raschem Erhitzen bei 220—225°, das wasserhaltige etwas niedriger. Toppellius und Pommerehne beobachteten, dass ihre Präparate bei raschem Erhitzen ziemlich übereinstimmend bei 210° schmolzen. Es scheint, dass sie die wasserhaltigen Salze zu ihren Schmelzpunktbestimmungen verwandt haben: wenigstens machen sie keine gegentheiligen Angaben.

Die Goldsalze.

Die erheblichsten Verschiedenheiten wiesen die Goldsalze Johnson's auf. Er erhielt sie in Form gelber Blättchen, wenn er die salzsaure Lösung des Kreatinins mit Goldchlorid versetzte und über Schwefelsäure im Vacuum verdunstete. Sie waren sämtlich wasserfrei, verhielten sich aber sehr verschieden gegen Aether. Das Goldsalz des Harnkreatinins wurde durch Aether nicht verändert; das des aus Harnkreatin erhaltenen Kreatinins wurde durch Aether zersetzt, indem Goldchlorid in Lösung ging und salzsaures Kreatinin zurückblieb; das aus Fleischkreatinin endlich löste sich in Aether, zersetzte sich aber beim freiwilligen Verdunsten der Aetherlösung.

Toppellius stellte sich die Goldsalze in der Weise dar, dass er einer kaltgesättigten salzsauren Kreatininlösung eine hinreichende Menge Goldchlorid zusetzte, worauf sich sehr bald grosse gelbe Blätter der Doppelverbindung abschieden. Ich fand es noch zweckmässiger, das salzsaure Kreatinin bei 40—50° in möglichst wenig Wasser zu lösen und dazu wenig mehr als die berechnete Menge Goldchlorid in Lösung zuzugeben. Die Flüssigkeit erstarrt dann sehr bald zu einem Brei von prächtigen, goldgelben Blättchen, welche abgesaugt und mit einer Mischung aus Alkohol und Aether nachgewaschen wurden.

Man erhält so immer krystallwasserfreie Chlorgolddoppelsalze. Sie sind in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich, unlöslich aber in Aether. Reiner Aether verändert dieselben durchaus nicht, wohl aber wasser- oder alkoholhaltiger, wobei in der Hauptsache Goldchlorid in Lösung geht, während etwas salzsaures Kreatinin zurückbleibt. In keinem Falle tritt aber glatt völlige Lösung ein, wie Johnson bei dem Goldsalze seines Fleischkreatinins beobachtete. Toppelius gibt an, dass sich die Goldsalze in viel Aether auflösen unter Hinterlassung eines gelblichweissen Rückstandes, welcher Kreatininreaction gab. Diese Beobachtung muss wohl auf Verwendung nicht ganz reinen Aethers zurückgeführt werden, während bei Johnson doch auch unreine Goldsalze mitgespielt haben müssen, zumal da bei der Art, wie er dieselben darstellte, eine Beimengung von überschüssigem Goldchlorid sehr leicht möglich erscheinen muss.

Erhitzt man die Lösung des Goldsalzes zum Sieden, so tritt Zersetzung ein, indem alles Gold metallisch abgeschieden wird. Die Lösung vermag aber noch weit mehr Goldchlorid zu reduciren.

Die bei 100° getrockneten Präparate schmolzen bei 170–174°; auch hier beobachtete ich, dass selbst so geringe Wassermengen, wie sie den nur lufttrockenen Präparaten anhängen, den Schmelzpunkt herabzudrücken vermögen. Brieger¹⁾ fand ihn bei 168°, Toppelius²⁾ bei 162° liegend.

Kreatininpikrat.

Das von Jaffé³⁾ zuerst dargestellte Kreatininpikrat schien mir besonders geeignet für den Identitätsbeweis der verschiedenen Präparate, weil es sehr leicht in grosser Reinheit zu erhalten ist und einen scharfen Schmelzpunkt besitzt.

Fügt man zu einer wässerigen Kreatininlösung Pikrinsäurelösung, so scheidet sich sehr bald das Pikrat in Gestalt schöner gelber Nadeln ab, die durch Umkrystallisiren

¹⁾ Ptomaine III, 86.

²⁾ l. c.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 398.

aus heissem Wasser oder Alkohol leicht gereinigt werden können.¹⁾

Den Schmelzpunkt des pikrinsauren Kreatinins fand ich in Uebereinstimmung mit Pommerehne bei 212—213°, während Brieger²⁾ 240° angibt.

Diese Angabe darf wohl berichtigt werden, da sowohl Pommerehne wie ich bei einer Reihe von Präparaten des verschiedensten Ursprungs stets übereinstimmend obige Werthe gefunden haben.

Auch hierbei verhielten sich also die verschiedenen Präparate durchaus gleich.

Sämmtliche Kreatininpräparate gaben die von Kramm³⁾ neuerdings beschriebene Nitrosoverbindung, wenn man ihre alkalische Lösung so lange mit Nitroprussidnatrium versetzte, als noch Rothfärbung eintrat, und dann mit Essigsäure ansäuerte. Bei genügender Concentration erstarrte die Flüssigkeit zu einem Krystallbrei der Nitrosoverbindung, die in allen Fällen die von Kramm angegebenen Eigenschaften hatte.

Völlig gleich war auch das Verhalten der verschiedenen Kreatininpräparate gegen Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure. Ueber die Eigenschaften und Zusammensetzung dieser Verbindungen soll demnächst gesondert berichtet werden.

Sehr mannigfach und verschieden sind die Angaben, welche sich über das Reduktionsvermögen des Kreatinins gegen alkalische Kupferlösung in der Litteratur finden.

Worm-Müller⁴⁾ stellte fest, dass sich nur Kupferoxydul

¹⁾ Auch aus einer mit Pikrinsäurelösung versetzten Kreatinlösung scheidet sich schon nach kurzem Stehen ebenfalls Kreatininpikrat ab.

A. Kossel⁵⁾ gibt beim mikroskopischen Nachweis des Kreatins an, dass sich Kreatinkrystalle beim Uebergiessen mit einer alkoholischen Pikrinsäurelösung mit einer «filzigen Auflagerung von pikrinsaurem Salz» überziehen. Auch dieser dünne Ueberzug stellt pikrinsaures Kreatinin dar, wie durch die Rothfärbung beim Lösen in verdünnter Natronlauge und durch den Schmelzpunkt leicht nachgewiesen werden kann.

²⁾ l. c.

³⁾ Centralbl. f. d. med. Wissensch., 35, S. 785—787.

⁴⁾ Pflüger's Archiv, Bd. XXVII, S. 59—86.

⁵⁾ Das Mikroskop und die Methoden der mikroskopischen Untersuchung v. Behrens, Kossel und Schieferdecker Bd. I, S. 284.

abscheidet, wenn ein genügender Ueberschuss von Kupfer vorhanden sei, während sonst das reducirte Kupfer in Lösung gehalten würde. In der That kommt es in allen Fällen zur Abscheidung von Kupferoxydul, wenn nur die Menge des reducirten Kupfers nicht gar zu klein ist und wenn genügend lange erhitzt wird. Es scheint, dass das zuerst reducirte Kupfer anfänglich als Kreatinin-Kupferoxydul, eine Verbindung, die Maschke¹⁾ zuerst dargestellt hat, in Lösung bleibt; erhitzt man dann weiter, so zerfällt auch diese Verbindung, und es kommt zur Abscheidung des Kupferoxyduls, ein Umstand, der besonders bei der quantitativen Bestimmung des reducirten Kupfers Beachtung verdient. Ueber die Mengen von Kupferoxyd, welche durch das Kreatinin reducirt werden sollen, gehen die Angaben der verschiedenen Autoren sehr auseinander.

Worm-Müller²⁾ sagt, ein Molekül Kreatinin scheine selbst beim Erhitzen mit viel Kupfer nicht mehr als 0,75 Moleküle Kupferoxyd zu reduciren.

Die andern Angaben beziehen sich fast alle auf Zucker, d. h. sie geben die Traubenzuckermengen an, denen das Kreatinin in der Reductionswirkung gleichkommt. Ich habe diese Werthe auf Kupfer umgerechnet (180 Traubenzucker = 315 Cu), in nachstehender Tabelle zusammengestellt, um die verschiedenen Angaben besser miteinander vergleichen zu können. Die Zahlen geben an, wieviel metallisches Kupfer einem Molekül Kreatinin entspricht.

Worm-Müller ³⁾	47,25
Johnson ⁴⁾	
Kreatinin aus Fleisch	140,00
" " Harn	157,50
" " Harnkreatin	126,00
Moritz ⁵⁾	163,36
Toppelius und Pommerehne ⁶⁾	
Kochdauer 2 Minuten	108,48
" 3 "	143,73
" 5 "	175,50

1) Zeitschr. f. analyt. Chem., Bd. XV

2) l. c.

3) l. c.

4) l. c.

5) Arch. f. klin. Med., Bd. 43.

6) l. c.

Ich habe mich bei meinen Versuchen ziemlich genau an die Angaben von Toppelius und Pommerehne¹⁾ gehalten und je 60 ccm. Fehling'scher Lösung mit 5 ccm. Kreatininlösung zum Sieden erhitzt und verschieden lange im Sieden gehalten. Das abgeschiedene Kupferoxydul wurde in bekannter Weise als Kupfer zur Wägung gebracht. Die Kreatininlösung war hergestellt durch Auflösen von 1,495 gr. reinen getrockneten salzsauren Kreatinins in 100 ccm. Wasser: sie war also $\frac{1}{10}$ molekular.

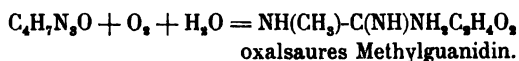
Unter Einhaltung obiger Mengenverhältnisse wurden die in nachstehender Tabelle zusammengestellten Werthe erhalten:

Kochdauer in Minuten	Gewogenes Cu	Kupfer für 1 Mol. Kreatinin
5	0,0888	} 175,1
	0,0863	
10	0,0914	} 181,8
	0,0940	
	0,0872	
	0,0910	
20	0,1066	213,2
30	0,137	} 268,0
	0,131	
60	0,1321	} 269,8
	0,1377	

Es geht daraus hervor, dass bei Innehaltung gleicher Bedingungen auch gleiche Werthe zu erhalten sind, da meine für 5 Minuten Kochzeit gefundenen Zahlen mit denen von Toppelius und Pommerehne für die gleiche Zeit gefundenen genau übereinstimmen. Dann zeigen meine Werthe, wie langsam die Reduction fortschreitet. Erst bei einstündigem Kochen scheint ein gewisser Stillstand einzutreten. Die bis dahin

¹⁾ l. c.

reducirte Kupfermenge scheint mir darauf hinzudeuten, dass die Oxydation nach folgender Gleichung verläuft:



1 Molekül Kreatinin wird also 2 Moleküle Sauerstoff zur Oxydation nöthig haben, was = 4 Molekülen Cu = 252 entspricht.

Eine genaue Feststellung dieses Verhältnisses scheitert daran, dass die Fehling'sche Lösung bei derartig langem Kochen selbst nicht unerhebliche Kupfermengen abzuscheiden beginnt.

Zur Zeit, als ich die Reductionsversuche ausführte, stand mir nur noch absolut reines Kreatinin aus Harn zur Verfügung, so dass ich Kreatinin aus anderer Herkunft nicht mehr zum Vergleich heranziehen konnte.

Ich glaube aber, dass die vorhergehenden Versuche auch allein schon zur Genüge beweisen, dass die von Johnson erhobenen Zweifel an der Identität des aus Harn oder Muskel erhaltenen Kreatinins jeder Berechtigung entbehren.

In der letzten Abhandlung sucht Johnson¹⁾ noch festzustellen, ob im Muskel Kreatin oder Kreatinin vorkommt, und findet dabei, dass der Muskel nur Kreatinin, kein Kreatin enthalte; das Kreatin entstehe erst nach dem Tode durch Einwirkung von Bakterien; dieser Vorgang spiele sich aber schon ab, lange bevor der allgemein als Fäulniss bezeichnete Process eintrete.

Er suchte dies so nachzuweisen, dass er ganz frisches, zerkleinertes Kuhfleisch mit Wasser durchknetete und sogleich auspresste. Die Auszüge vermischte er dann sofort mit ungefähr dem gleichen Volumen gesättigter Quecksilberchloridlösung, wodurch Eiweiss und Blutfarbstoff ausgefällt und durch Filtration abgetrennt wurden.

Andere Fleischmengen blieben vor dieser Behandlung

¹⁾ l. c. 50, 287—302.

erst 24—36 Stunden lang liegen und der «Bakterieneinwirkung» überlassen. Aus den filtrirten Auszügen, bei denen durch den Sublimatgehalt jede Bakterieneinwirkung ausgeschlossen war, schied sich das Kreatinin als Quecksilberchloriddoppelverbindung ab, doch war diese Abscheidung erst nach wochen-, ja monatelangem Stehen beendet. Das Quecksilberchloriddoppelsalz wurde dann in bekannter Weise auf Kreatinin verarbeitet.

Aus den Filtraten von der Kreatininfällung wurde das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, die Salzsäure durch Bleihydroxyd entfernt und zum Syrup verdunstet. Hierbei lieferten nur diejenigen Portionen, welche vor der Verarbeitung längere Zeit gelegen hatten, Krystalle von Kreatin, welchen Umstand Johnson auf die Thätigkeit von Bakterien zurückführen zu müssen glaubt. Johnson selbst stellt in seiner Arbeit fest, dass auch eine reine Kreatinlösung bei längerem Stehen, sogar schon nach 24 Stunden, Abscheidungen von Kreatinin-Quecksilberchlorid liefert, zieht aber trotzdem daraus nicht den so naheliegenden Schluss, dass bei seiner Art der Darstellung des Kreatinins aus dem Muskel das Kreatinin erst aus Kreatin entsteht, wohl weil er eben das aus Fleisch erhaltene Kreatinin verschieden hielt von den andern. So verleitet ihn diese irrthümliche Beobachtung zu einem neuen Fehler, obwohl ihm doch der zeitlich so überaus grosse Unterschied in der Abscheidungsgeschwindigkeit der Quecksilberverbindungen — 2 Tage gegen mehrere Monate — hätte zu denken geben müssen.

Kemmerich¹⁾ bestätigt übrigens gelegentlich diese Angaben, insofern er in frischem, gutem Fleischextracte nur Kreatinin, kein Kreatin fand, während er selbst früher — und viele andere vor und nach ihm — in der Hauptsache nur Kreatin gefunden hatte. Er meint, dieser auffällige Befund bedürfe der Aufklärung. Ich halte es für nicht ganz unwahrscheinlich, dass in ganz frischem Fleischextract sich in der Regel mehr Kreatinin als Kreatin finden wird, besonders wenn das Eindampfen recht lange Zeit in Anspruch genommen hat; so gibt

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XVIII, S. 411.

doch eine reine Kreatinlösung schon nach einmaligem Aufkochen die Weyl'sche Reaction. Beim Lagern des Extractes kann ja dann wieder eine Rückbildung stattfinden.

Dass für den Kaninchenmuskel die Angaben Johnson's nicht zutreffen, konnte K. A. H. Mörner¹⁾ schon gelegentlich feststellen, als er das aus frischen und gefroren zerriebenen Muskeln erhaltene Plasma bei 0° stehen liess. Es schieden sich dabei sehr bald Krystalle ab, die sich als Kreatin erwiesen, obgleich hierbei an eine Bakterienwirkung nicht zu denken war.

Zur Nachprüfung der Angaben Johnson's wurde reines Muskelfleisch frisch getödteter Thiere zerkleinert und direkt mit einer verdünnten Sublimatlösung extrahirt, um die von Johnson gefürchtete Bakterienwirkung auszuschliessen. Es wird so die Hauptmenge der Eiweisskörper ausgefällt, während Kreatin und Kreatinin neben anderen Extractivstoffen in Lösung bleiben. Der nach kurzem Stehen abgepresste und filtrirte Muskelauszug kann in der Regel direkt zur Anstellung der Weyl'schen Probe verwandt werden. Sollte er noch viel Quecksilberchlorid enthalten, so ist dies vor dem Anstellen der Weyl'schen Probe zu entfernen, da sonst bei Zusatz von Natronlauge eine Fällung eintritt, welche sämtliches Kreatinin enthält. Man kann daher auch ohne Weiteres diese Fällung mit Schwefelwasserstoff zersetzen und das concentrirte Filtrat auf Kreatinin prüfen.

In dieser Weise untersucht, gab der Kaninchenmuskelauszug gar keine Weyl'sche Reaction, Hunde- und Rindermuskel aber nur eine sehr schwachè. Eine deutliche Rothfärbung gaben aber alle 3 Auszüge, nachdem sie einige Zeit auf dem Wasserbade mit verdünnter Schwefelsäure erhitzt worden waren.

Die Hauptmenge der Auszüge wurden dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure völlig ausgefällt. Hierbei geht Kreatinin in den Niederschlag, Kreatin bleibt in der Lösung.

1) Skandinav. Arch. f. Physiologie, Bd. V, S. 272.

Dem Phosphorwolframsäureniederschlag wurde das phosphorwolframsaure Kreatinin durch mehrmaliges Auskochen mit heissem Wasser entzogen; die erhaltenen Lösungen wurden mit Aetzbaryt bis zur alkalischen Reaction versetzt, dann mit Kohlensäure gesättigt, filtrirt und so Phosphorwolframsäure und überschüssiger Baryt entfernt. Mit dem nach dem Verdunsten gebliebenen Rückstand wurde dann die Weyl'sche Probe angestellt. Rind- und Hundemuskel gaben dabei eine sehr deutliche Reaction, während der Kaninchenmuskelauszug nur eine sehr schwache Rothfärbung gab, was im besten Einklange mit den Beobachtungen steht, die bei direkter Ausführung der Weyl'schen Probe im Muskelauszug gemacht wurden.

Aus den Filtraten von der Phosphorwolframsäurefällung wurden die Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure durch überschüssigen Baryt, dieser wieder durch Kohlensäure entfernt und zur Krystallisation verdunstet. In dem nach dem Erkalten gebliebenen Krystallbrei konnte das Kreatin schon durch seine Krystallform erkannt werden. Es wurde dann durch Behandeln mit Säuren in Kreatinin übergeführt und als solches durch die bekannten Reactionen identificirt.

Aus diesen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, dass im Muskel normaler Weise Kreatin neben wenig Kreatinin vorkommt, wodurch die gegentheiligen Beobachtungen Johnson's hinfällig werden und die älteren Angaben wieder zu Recht bestehen.

Die Eiweisskörper der Schilddrüse.

Von

Dr. med. et. phil. **Ad. Oswald.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 17.)

(Der Redaction zugegangen am 8. Februar 1899.)

Während zahlreiche Autoren die Function der Schilddrüse auf klinischem, experimentellem und therapeutischem Wege zu ergründen suchten, ist die Anzahl der Forscher, welche die chemische Untersuchung der Drüse ins Auge gefasst haben, nur eine recht spärliche zu nennen. Und doch bietet zweifelsohne die chemische Bearbeitung der Schilddrüse den Schlüssel zur Klarlegung ihrer uns beinahe mit jeder Entdeckung verwickelter erscheinenden Function. Ist es uns doch erst dann möglich, über die Rolle, welche im thierischen Haushalte dieses für das Leben so wichtige Organ spielt, und über dessen so innige Beziehung zu dem allgemeinen Stoffumsatze Genaueres auszusagen, wenn wir die in ihm auftretenden specifisch wirksamen Produkte isolirt und in ihren Eigenschaften und ihrer Zusammensetzung kennen gelernt haben. Dann auch wird sich von selbst ergeben, inwieweit die in der Neuzeit auftauchenden Theorien über die Function der Schilddrüse ernste Kritik vertragen.

Durch die bedeutungsvolle Entdeckung Baumann's betreffend das Vorhandensein von Jod in der Thyreoidea und durch die Darstellung eines jodhaltigen organischen, im gleichen Sinne wie die ganze Drüse wirksamen Complexes aus derselben, des Jodothyryns, haben unsere Kenntnisse über die Function der Thyreoidea ihre chemisch-physiologische Grundlage erhalten.

Die glänzenden Arbeiten Baumann's, durch den jähen Tod des Forschers unterbrochen, und die in der gleichen Richtung von Roos fortgesetzten Untersuchungen sind aber keineswegs erschöpfend. Eine im Vergleich zu der von Baumann angewandten minder eingreifende Methode zur Isolirung der in der Schilddrüse vorhandenen wirksamen Substanz musste zu noch unbekannten Thatsachen führen.

In der Trennung der verschiedenen in einem Organe enthaltenen Eiweisskörper durch Aussalzen derselben aus dem betreffenden Organextract, namentlich mittelst Ammoniumsulfats, besitzen wir das denkbar am wenigsten eingreifende Mittel zu deren Isolirung, da die Eiweissstoffe dabei weder an ihren chemischen noch an ihren physikalischen Eigenschaften irgend welche Veränderung erleiden. In Anbetracht der von Baumann gemachten Angabe, dass in der Thyreoidea das Jodothylin an Eiweisskörper gebunden vorkommt, habe ich mich bemüht, die Eiweisskörper der Schilddrüse mit Hülfe der Salzmethode zu isoliren und dieselben betreffs ihrer Zusammensetzung und physiologischen Bedeutung näher zu untersuchen.

Da die in der Litteratur vorhandenen Angaben sich in vielen Punkten ganz erheblich widersprechen und manche Autoren, bisweilen zu ihrem eigenen Nachtheile, von den bereits beschriebenen Thatsachen keine Notiz genommen haben, so sollen zunächst die bisher erschienenen, auf die chemische Natur der Schilddrüse bezüglichen Arbeiten kurz besprochen werden.

Bisherige Untersuchungen.

Bubnow¹⁾ war der erste, welcher die Schilddrüse einer chemischen Untersuchung unterwarf. Aus dem Extract, welches er mittelst 10 procentiger Kochsalzlösung aus Schilddrüsen vom Menschen und Rinde erhielt, die vorerst durch vier- bis sechsmal wiederholtes Ausziehen mit Wasser von ihrem Hämoglobingehalt befreit worden waren, gewann er durch Fällung mit Essigsäure einen Eiweisskörper, den er Thyreoprotein nannte.

¹⁾ Bubnow, Zeitschr. für physiol. Chem. Bd. VIII, S. 1. 1883.

Darauf wurde der Drüsenrückstand mit verdünnter wässriger Kalihydratlösung (1 Th. KOH : 1000 Th. Wasser) neuerdings ausgezogen und aus dem erhaltenen Extract durch Fällern mit Essigsäure ein zweites Thyreoprotein gewonnen. Durch abermaliges Ausziehen mit verdünntem Alkali und Fällern mit Essigsäure wurde schliesslich ein drittes Thyreoprotein erhalten.

Diese drei Produkte, welche Bubnow als drei verschiedene Körper betrachtete und als Thyreoprotein I, II und III bezeichnete, wichen jedoch in ihrer Elementarzusammensetzung nur unerheblich von einander ab. Es liegt auf der Hand, dass Thyreoprotein II und III einen und denselben Körper darstellen, da beide durch genau das gleiche Verfahren gewonnen wurden, somit das Thyreoprotein III nur den Rest von Thyreoprotein II darstellte, welcher bei der einmaligen unvollständigen Extraction nicht in die alkalische Lösung übergegangen war. Aber auch das Thyreoprotein I ist von II und III nicht erheblich verschieden.

In der That hat sich herausgestellt, dass die Annahme von drei Proteiden eine willkürliche war, und dass es in der Schilddrüse nur einen einzigen den Thyreoproteinen Bubnow's entsprechenden Körper gibt. Ich bin ferner in der Lage gewesen die Originalpräparate Bubnow's, welche in der Sammlung des hiesigen Institutes aufbewahrt sind, auf ihren Gehalt an Jod zu untersuchen, und habe in der That Jod darin nachweisen können.

Bubnow fand ausserdem in der Schilddrüse Xanthin, Hypoxanthin, Milchsäure und Kreatin.

Nach Bubnow hat Gourlay¹⁾ sich bemüht, die Natur der in der Schilddrüse vorhandenen Eiweisskörper festzustellen. Er gewann daraus ein Nucleoalbumin sowohl nach der Methode von Wooldridge als nach der von Halliburton. Dieses Thyreo-Nucleoalbumin, welches sehr reich an Phosphor war, hielt Gourlay für das wirksame Princip der Schilddrüse und identificirte es mit dem Colloid. Es sei gleich hier bemerkt, dass nach meiner Erfahrung die wirksame Substanz kein Nucleoalbumin ist, und dass das Ergebniss Gourlay's auf der Unzulänglichkeit der angewendeten Methode beruht.

¹⁾ Gourlay, Journ. of Physiol. vol. XVI, p. 23. 1894.

Darauf erschienen Baumann's¹⁾ bedeutungsvolle Mittheilungen über die Anwesenheit des Jods in der Schilddrüse und über die Gewinnung des Jodothyrens. Auf diese hinreichend bekannten Arbeiten an dieser Stelle näher einzugehen, ist überflüssig. Baumann hat bekanntlich das Jodothyren durch mehrstündiges Kochen der Schilddrüse mit 10%iger Schwefelsäure und Extrahiren des gebildeten Rückstandes mit Alkohol von 90 Procent gewonnen. Hervorgehoben mag werden, dass Baumann die Aeusserung gemacht hat, das Jodothyren komme in der Schilddrüse an Eiweisskörper gebunden vor. (Thyroglobulin resp. -albumin)²⁾. Die Behauptung, dass das Jod sowohl an Globulin als an Albumin gebunden sei, wurde jedoch nur auf Grund einer mehr gelegentlichen Beobachtung aufgestellt, welcher Baumann nicht viel Werth beizulegen schien.

Baumann hat das wässrige salzhaltige Organextract mit dem 15fachen Volumen destillirten Wassers verdünnt und in die Lösung Kohlensäure eingeleitet. Dadurch entstand ein flockiger Niederschlag. Das von letzterem getrennte Filtrat gab nach Ansäuern mit Essigsäure beim Kochen eine reichliche Coagulation eines Eiweisskörpers, welchen Baumann für ein Albumin hielt. Globulin wie Albumin waren jodhaltig. Dass aber bei dieser Behandlung eine vollständige Fällung der Globuline nicht erreicht werden kann, ist eine bekannte Thatsache, weshalb über diesen Punkt noch exactere Versuche angestellt werden mussten.

Baumann hat ferner durch Verdauung der Schilddrüse mittelst Pepsinchlorwasserstoff einen in Säuren unlöslichen, in Alkalien leicht löslichen Rückstand erhalten, den er für identisch mit dem durch Säurespaltung gewonnenen Jodothyren hält.

Kurz nach Baumann's erster Mittheilung erschienen mehrere Arbeiten von Notkin.³⁾ Dieser Autor isolirte aus

¹⁾ Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXI, S. 319 (1895) — Baumann und Roos *ibid.* S. 481 (1896) — Baumann *ibid.* Bd. XXII, S. 1 (1896) — Münch. med. Wochenschr. Nr. 14. 1896.

²⁾ Die Annahme, dass das Jodothyren auch frei in der Schilddrüse vorkommt, ist mündlicher Mittheilung zu Folge noch von Baumann selbst als eine irrige erkannt worden.

³⁾ Notkin, Wien. Med. Wochenschr., 1895, Nr. 19 und 20. — Apothekerzeitung 1896, Nr. 13. — Virchow's Arch., Supplementheft zu Bd. 144 (1896) S. 224.

wässerigen, resp. 5% Kochsalz bzw. Ammonchlorid enthaltenden Extracten der Schilddrüse (vom Schaf, Kalb, Ochsen und Schwein) durch Sättigung mit Magnesiumsulfat oder Halbsättigung mit Ammonsulfat einen eiweissartigen Körper, den er Thyreoproteid nannte. Zur vollständigen Reinigung wurde das Thyreoproteid 5 bis 6 Mal in Wasser gelöst und jeweilen mit Ammonsulfat oder durch verdünnte HCl (1‰) gefällt, wobei es schliesslich jodfrei erhalten wurde, eine Angabe, die, wie ich vorgreifender Weise bemerken will, durch meine Untersuchungen nicht bestätigt wurde. Das Thyreoproteid, welches weder auf Zusatz von destillirtem Wasser und nachheriges Einleiten von Kohlensäure, noch durch Eintragen von Kochsalz bis zur Sättigung aus seiner Lösung gefällt wurde, zeigte in einer 10%igen Salzlösung eine Gerinnungstemperatur von 58°. Durch Kochen mit 5%iger Schwefel- bzw. Salzsäure konnte daraus eine reducirende Substanz erhalten werden, welche sich in Form eines Osazons isoliren liess. Durch längeres Kochen des Thyreoproteids mit destillirtem Wasser bzw. mit verdünnten Säuren konnte, nach der von Landwehr zur Darstellung des thierischen Gummis angegebenen Methode das ursprüngliche nicht reducirende Kohlehydrat erhalten werden, woraus durch Kochen mit Säuren das bei 160° schmelzende Osazon gewonnen wurde. Ausser dem eben genannten Körper hat Notkin aus der Schilddrüse noch ein Nucleoalbumin dargestellt, welches er jodhaltig fand, eine Angabe, die sich bei meinen Untersuchungen gleichfalls als unrichtig erwies.¹⁾

1) Nach Notkin's Vorstellung soll nun das Thyreoproteid ein Produkt des allgemeinen Stoffwechsels sein, das für den Körper ein Gift darstellt, aber durch ein in der Schilddrüse vorkommendes Enzym unschädlich gemacht wird. Notkin kam zu dieser Ansicht dadurch, dass er thyreoidectomirten Thieren das Thyreoproteid einverleibte (intravenös, in die Bauchhöhle oder subcutan), wonach die Thiere unter dem Bilde der Tetanie zu Grunde gingen. Dass aber in Wirklichkeit der Mangel der Schilddrüse an und für sich und nicht die Einverleibung jenes Thyreoproteids die Ursache der Tetanie gewesen ist, ferner dass das Thyreoproteid kein für den Organismus schädliches Stoffwechselproduct

Vor Notkin hat Morkotun¹⁾ ein Nucleoalbumin aus der Schilddrüse von Ochsen gewonnen, für dessen Reinheit die von Morkotun angewandte Darstellungsweise (Fällung mit verdünnter Salzsäure aus dem durch Kochen von den gerinnbaren Eiweissstoffen befreiten Organextracte) jedoch keine Garantie bietet.²⁾

Hutchison³⁾ bereitete Extracte aus Hammelschilddrüsen mit 5%iger Magnesiumsulfatlösung resp. verdünnten Alkalien (1 Theil NaOH:1000 Theile Wasser), woraus er durch Zusatz weniger Tropfen Essigsäure einen flockigen Niederschlag gewann, der, wie der Autor bemerkt, mit dem Thyreoprotein Bubnow's und dem Thyreo-Nucleoalbumin Gourlay's (folglich auch mit Notkin's Thyreoproteid) identisch ist. Diesen Körper, welcher in verdünnten Salzlösungen, besser aber in Alkalien

darstellt, geht aus der weiter unten anzuführenden Thatsache hervor, dass sich nach der von Notkin zur Herstellung des Thyreoproteids angewandten Methode (Aussalzen des Organextractes durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat) aus der Schilddrüse ein Körper isoliren lässt, der als integrierenden Bestandtheil Jod in constanter Menge enthält und bei Spaltung Jodothyryn liefert.

1) Morkotun, Wratsch 1895. Nr. 37 (russisch).

2) 1896 haben Drechsel und Kocher jun. (Centralbl. f. Physiol. Bd. IX, S. 705) aus durch Kochen unter Zusatz von Essigsäure enteiweissten wässerigen Schilddrüsenextracten durch Fällen mit Phosphorwolframsäure ein Produkt erhalten, welches, von der Phosphorwolframsäure getrennt, sich in Krystallen ausschied. Ob dieser Körper ein spezifisches Produkt der Schilddrüse darstellt, ist der Mittheilung nicht zu entnehmen. Hervorgehoben mag werden, dass Roos (Münch. med. Wochenschr. Nr. 47, 1896) und Hutchison (Brit. med. journ., 21. März 1896) die eiweissfreien Filtrate der Drüse beim Kropf resp. bei thyreoidectomirten Thieren unwirksam fanden.

Ebenso unwirksam erwies sich bei näherer Prüfung (Roos, Münch. med. Wochenschr. Nr. 47, 1896 und Magnus-Levy, Deutsche med. Wochenschr. 1896, Nr. 31 und Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 33) ein Präparat, das S. Fränkel hergestellt und Thyreoantitoxin genannt hat (Wien. Med. Blätter Nr. 48, 1895; — ibid. 1896 Nr. 13, 14 u. 15). Dasselbe entstammte wässerigen Schilddrüsenextracten, welche mit neutralem essigsauren Blei enteiweisst waren.

3) Hutchison, Journ. of Physiol. XX, S. 474, 1896 und Brit. med. journ., jan. 1897.

löslich ist, durch Sättigung mit Magnesium- oder Ammoniumsulfat aus seiner Lösung ausgefällt wird und in einer 5%igen Magnesiumsulfatlösung bei 57° coagulirt, betrachtet Hutchison als identisch mit dem Schilddrüsencolloid der Anatomen. Im Gegensatz zu Notkin konnte er jedoch keinen reducirenden Körper daraus abspalten. Hutchison's Colloid enthält 0,045% Phosphor, daneben Jod in nicht bestimmter, jedoch sehr geringer Menge. Durch Pepsinverdauung wird es in einen eiweissartigen und einen eiweissfreien Bestandtheil zerlegt; beide Theile sind jodhaltig. Der eiweissfreie Körper, welcher in Wasser, verdünnten Salzlösungen, sowie in verdünnten Säuren unlöslich, in Alkalien dagegen leicht löslich ist, enthält 0,8% Phosphor und 0,7% Jod, ausserdem noch Schwefel. Hutchison betrachtet das Colloid als eine Verbindung eines eiweissartigen mit einem eiweissfreien Körper, den er dem Jodothyryn Baumann's zur Seite stellt. Ausser der Colloidsubstanz gewann er aus der Schilddrüse noch ein Nucleoalbumin. Das Colloid erwies sich bei thyreoidectomirten Thieren und bei Myxoedem als wirksam, ebenso jede seiner beiden Componenten, die eiweissfreie aber bedeutend mehr als die eiweissartige. Das Colloid ist nach dem Autor die einzig wirksame Substanz der Schilddrüse.

Die Darstellungsweise der «Colloidsubstanz» nach Hutchison leistet jedoch keine Gewähr für die Einheitlichkeit des gewonnenen Produktes, da durch das Ausziehen der Schilddrüse mit verdünnten Alkalien sämtliche Eiweissstoffe der Drüse in Lösung gehen und die einmal gelösten Eiweisskörper auf Zusatz von Säuren sämtlich wieder gefällt werden. Wir werden in der That sehen, dass Hutchison's Colloid ein Gemenge zweier in ihren Eigenschaften, Zusammensetzung und Wirksamkeit vollkommen verschiedener Eiweisskörper ist.

In einer früheren Abhandlung¹⁾ habe ich, gestützt auf zahlreiche Untersuchungen an menschlichen Schilddrüsen, festgestellt, dass der Jodgehalt der Schilddrüse dem Colloidreichtum parallel geht, dass somit das Jod in der Colloidsubstanz

1) Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem., XXIII, S. 365. 1897.

enthalten ist, zu welchem Schluss auch Hutchison, wie soeben bemerkt, auf anderem Wege gekommen ist.

Als meine Untersuchung bereits im Gange war, erschienen weitere einschlägige Arbeiten, auf die kurz eingegangen werden muss.

Tambach¹⁾ fand bei Verarbeitung einer sehr grossen Menge von Schweinsschilddrüsen, dass die jodhaltigen Eiweissverbindungen nahezu völlig mit Wasser aus der Drüse ausziehbar sind, und stellte den Satz auf, dass die Menge dieser ausziehbaren Eiweissverbindungen je nach der Jahreszeit und der Herkunft beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist, während die absolute Jodmenge (auf die Gesamtdrüse bezogen) in der Schilddrüse (vom Schwein) fast stets die gleiche ist.²⁾

Nach Tambach ist ferner das Gesamtjod der Drüse derart vertheilt, dass ca. 96 % des Jods als Jod-Eiweissverbindungen, 2 % dagegen in einer durch Eiweissfällungsmittel nicht fällbaren, wasserlöslichen, aber festgebundenen Form und 2 % in einer sich wie Jodide verhaltenden Form vorkommt. Gegen dieses Ergebniss kann jedoch der Einwand erhoben werden, dass durch die Art und Weise, wie Tambach die Jodeiweissstoffe fällte (Versetzen mit Essigsäure und Kochen) ein Theil derselben als Acidalbumin, enthaltend die von Tambach gefundenen wasserlöslichen, aber festgebundenen 2 % Jod, in Lösung geblieben, das übrige Jod (2 %), welches in Jodidform vorhanden sein soll, aber erst durch die in vitro vorgenommenen Manipulationen³⁾ abgespalten sein konnte.

Tambach fand ferner, dass weder bei künstlicher Magensaft- noch bei Pankreasverdauung Jodothyryn abgespalten wird. Endlich kam er zu dem Schluss, dass das Jod in den Jod-

1) Tambach, Zeitschr. f. Biol., N. F., Bd. XXVIII., S. 549.

2) Diese Angabe steht mit früheren Beobachtungen von mir in direktem Widerspruch. Ich habe nachweisen können (loc. cit. p. 308), dass der absolute Jodgehalt der Schweinsschilddrüsen zwischen 0,6 und 8,8 mgr. schwankt. Tambach gibt zu seiner Behauptung keine analytischen Belege.

3) Siehe Fussnote 3), Seite 25.

eiweisskörpern der Schilddrüse nicht nur in einer, sondern in verschiedener Form gebunden sein müsse, da nur ein Antheil desselben bei entsprechender Behandlung in Jodothyryn, ein anderer in jodärmere, peptonähnliche Körper übergeführt werde, aus welchen Jodothyryn nicht abzuspalten sei.

Blum¹⁾ vermochte in der Schilddrüse kein freies Jodothyryn aufzufinden. Als Träger des Jods spricht er ausschliesslich einen Eiweisskörper an, der mit den «Albuminen» die Fähigkeit gemein hat, beim Erhitzen zu coaguliren und mit Formaldehyd uncoagulirbare Verbindungen zu bilden. Das Jodothyryn geht aus dieser Substanz nach Blum stets durch tiefgreifende Zersetzung hervor und stellt ein Spaltungsprodukt von schwankender Zusammensetzung dar. Diesem Befund entsprechend bezeichnet Blum das Jodothyryn als ein «willkürliches Spaltungsprodukt» der Jodsubstanz der Thyreoidea.

Was letzteren Punkt anlangt, so hat, wie oben bemerkt, bereits Baumann²⁾ darauf hingewiesen, dass das Jod in der Schilddrüse an Eiweissstoffe gebunden vorkommt (Baumann's Thyrojodalbumin resp. -globulin). Wenn aber Blum speciell auf die Zugehörigkeit des Jodeiweisses der Thyreoidea zu den Jodeiweisskörpern, welche künstlich hergestellt worden sind, hindeutet, so muss bemerkt werden, dass zur Zeit kein Befund vorliegt, welcher über die Art der Bindung des Jods im Schilddrüseneiweiss Aufklärung gäbe, somit die Zusammenstellung desselben mit den künstlichen Jodeiweisskörpern weiterer Beweise bedarf.

Dass aus dem Jodeiweiss der Schilddrüse, namentlich dem Thyrojodalbumin, durch Sieden mit Schwefelsäure das Jodothyryn besonders reichlich erhalten wird, hat übrigens schon Baumann (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 488) ausdrücklich bemerkt.

Eine Entscheidung der Frage, ob das Jodothyryn im Jodeiweiss einem completen Eiweissmolekül angelagert ist, oder

1) Blum, Münch. med. Wochenschr. 1898. Nr. 8, 9 u. 11. — Verhandlg. d. Congr. f. inn. Med. XVI. Congress 1898. — Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 160.

2) Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 488 u. 489.

einem auch sonst regelmässig im Eiweiss vorkommenden, hier aber jodhaltigen Complexe entspricht, ist durch die Untersuchungen Blum's nicht gegeben.

Auf die theoretischen Vorstellungen über die Wirkungsweise der Schilddrüse, welche Blum entwickelt hat, soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

F. Blumenthal¹⁾ hat aus der Schilddrüse, nach der Methode von Hammarsten, ein Nucleoproteid dargestellt, welches Pentosen enthalten soll. Auf die Besprechung dieses Nucleoproteids wird weiter unten (S. 37) eingegangen werden.

Reinbach²⁾ ist es gelungen, aus Kröpfen ein bei 193° schmelzendes Osazon zu gewinnen, welchem der Name Strumosazon beigelegt wurde. Das gleiche Osazon konnte auch aus dem Niederschlag erhalten werden, welcher in dem wässrigen Extract des Kropfes auf Zusatz von Essigsäure entsteht, und welchen Reinbach als Kropfcolloid bezeichnet. In der That stellt dieser Niederschlag das Colloid der Anatomen dar. Chemisch entspricht es dem Colloid Hutchison's. Die bei Besprechung der Hutchison'schen Arbeit bezüglich der Einheitlichkeit jenes Körpers gemachten Bemerkungen gelten in Folge dessen auch für Reinbach's Kropfcolloid.

Endlich hat noch Hutchison³⁾ das soeben erwähnte Colloid aus Hammelsschilddrüsen aus verschiedenen Gegenden Englands dargestellt und darin einen wechselnden Jodgehalt gefunden, der zwischen 0,12 und 0,46% Jod, im Durchschnitt 0,309% betrug. Da aber jenes Colloid ein Gemenge zweier Eiweisskörper darstellt, so liegt der Einwand nahe, dass diese Schwankungen im Jodgehalte nur auf wechselnden Beimengungen des jodfreien Eiweisskörpers beruhen. Damit sei jedoch nicht behauptet, dass der eigentliche Jodeiweisskörper, den wir später kennen lernen werden, nicht, je nach der Herkunft, verschiedene Mengen Jod enthalten könnte.

1) Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medic., Bd. 34, S. 173.

2) Reinbach, Centralbl. f. Chirurgie. 1898. Nr. 21.

3) Hutchison, Journ. of Physiol., Bd. XXIII, S. 179 (1898).

Eigene Untersuchungen.

I. Ueber die Bindungsweise des Jods in der Schilddrüse.

Da Baumann¹⁾ und Drechsel²⁾ schon festgestellt haben, dass durch Extraction mittelst physiologischer Kochsalzlösung die Jodverbindungen aus der Schilddrüse zu gewinnen sind, war mein erstes Bestreben, zu ermitteln, ob alle in der Schilddrüse vorhandenen jodhaltigen Verbindungen in die wässrige Lösung übergehen. Zu diesem Zwecke wurden 99,5 gr. menschliche Schilddrüsen fein zerhackt und 5 gr. des gut gemischten Breies zur Bestimmung des Jodgehalts benützt. Derselbe betrug 1,16 mgr. Jod, woraus sich der Gehalt für die gesammte übrige Menge des Breies auf 21,92 mgr. berechnet. Der mit Quarzsand gut verriebene Drüsenbrei wurde nun zu wiederholten Malen unter Zusatz von Thymol mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und dann einige Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Die Extracte wurden eingedampft und im Rückstand die Jodmenge bestimmt. Dabei ergab sich folgendes Resultat:

Das 1. Extract	enthielt	9,85 mgr. Jod,
» 2. »	»	3,31 »
» 3. »	»	1,6 »
» 4. »	»	0,7 »
» 5. »	»	0,7 »
» 6. »	»	0,4 »
» 7. »	»	0,3 »

etc. etc.

Nach dem 10. Extract waren bereits von den in dem Brei vorhandenen 21,92 mgr. Jod, 17,26 mgr. aus den wässrigen Lösungen gewonnen. Bedenkt man aber, dass auf diese einfache Weise, trotz wiederholten Zerreibens mit Quarzsand, bei weitem nicht alle Gewebszellen zertrümmert werden, somit auch ihren Inhalt nicht an die wässrige Lösung abgeben, so ist die Annahme berechtigt, dass bei vollkommener Zertrümme-

1) Baumann u. Roos, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 487.

2) Drechsel, Centralbl. f. Physiol., Bd. IX, S. 704.

rung der Zellen alle jodhaltigen Verbindungen durch verdünnte Salzlösungen extrahirt worden wären.¹⁾ Diese Vermuthung ist übrigens durch die obenerwähnte, im Laufe meiner Untersuchungen erschienene Arbeit Tambach's²⁾ bekräftigt worden, welcher 97,8% der Jodeiweissverbindungen mit Wasser resp. physiologischer Kochsalzlösung extrahiren konnte. Eine vollständigere Erschöpfung ist aber, im Hinblick auf die Schwierigkeiten, die sich dem Extrahiren von Organbrei entgegenstellen, überhaupt nicht zu erwarten.

Es galt sodann festzustellen, ob im Drüsenextract sämmtliches Jod in organischer Bindung vorkommt. Zu diesem Zweck wurden die Eiweisskörper aus demselben durch Fällung mit Phosphorwolframsäure entfernt, das Filtrat stark alkalisch gemacht und eingedampft. In dem Rückstand war kein Jod nachzuweisen. Das Jod tritt also, entgegen der Meinung Tambach's, nur in organisch gebundener Form auf. Jod in Jodidform ist nicht nachzuweisen.³⁾

Sodann stellte ich mir die Frage, ob in dem wässerigen Drüsenextract bloss ein oder mehrere Eiweisskörper vorhanden sind und, wenn letzteres der Fall, ob alle oder nur einer derselben das Jod enthält. Zur Beantwortung dieser Frage wurde versucht, durch Aussalzen mittelst Ammoniumsulfats die Eiweisskörper getrennt zu gewinnen. 56 gr. Hammelschilddrüsen wurden fein zerhackt, mit Glasstaub im Mörser zerrieben, sodann mit 700 ccm. 0,75%iger NaCl-Lösung versetzt und unter Zusatz einiger Tropfen einer alkoholischen Thymollösung

1) Der Versuch, eine vollständigere Extraction durch Auspressen des Drüsenbreies, bei einem bis auf 550 Atmosphären gesteigerten Druck, zu erzielen, scheiterte daran, dass die zahlreichen Bindegewebsfasern, welche die Drüsenmasse durchsetzten, die feinen Oeffnungen des Pressbehälters verstopften.

2) Tambach, l. c.

3) Es ist wohl möglich, dass die 2% Jod, welche Tambach im eingeeengten Extracte direkt nach Ansäuern der Lösung und Versetzen mit salpetriger Säure mit Schwefelkohlenstoff ausschütteln konnte, durch die Behandlungsweise (längeres Kochen in alkalischer Lösung behufs Einengung des Extractes) aus ihrer organischen Bindung abgespalten worden sind.

24 Stunden im Eisschranke belassen. Das vom Drüsenbrei getrennte Extract wurde wiederholt auf das gleiche Filter gegossen, bis das Filtrat klar ablief. In dem letzteren wurden alsdann, nach dem zuletzt von E. P. Pick¹⁾ beschriebenen Verfahren, die Fällungsgrenzen der in Lösung vorhandenen Eiweisskörper bestimmt. Es stellte sich heraus, dass bei einer Salzconcentration, die einer Lösung entspricht, welche 2,6 Volumen gesättigte Ammonsulfatlösung auf 10 Volumen enthält (also 2,6 ccm. Ammonsulfatlösung auf 2 ccm. Extract und 5,4 ccm. Wasser), ein Eiweisskörper auszufallen beginnt, dessen Fällung vollständig ist, wenn 4,4 Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung auf ein Gesamtvolumen von 10 kommen (also 4,4 ccm. Ammonsulfatlösung auf 2 ccm. Extract und 3,6 ccm. Wasser). Da bis zu einem Zusatz von 6 Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung kein weiterer Eiweisskörper ausfällt, so kann der Einfachheit halber der erste Eiweisskörper durch Versetzen des wässerigen Extracts mit dem gleichen Volumen concentrirter Ammonsulfatlösung gefällt werden. Wird nun die Salzconcentration weiter erhöht, so fällt ein zweiter Eiweisskörper aus, von dem die untere Fällungsgrenze bei einem Gehalt der Lösung von 6,4, die obere bei einem solchen von 8,2 Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung liegt. Nach der Ausscheidung beider Eiweisskörper zeigt die Extractionsflüssigkeit beim Kochen und nachherigem Zusatz von Essigsäure keine Trübung mehr, gibt auch keine Biuretreaction, ist also eiweissfrei. Der Einfachheit halber kann also der zweite Eiweisskörper durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz bis zur Sättigung aus seiner Lösung gefällt werden.

Beide Eiweisskörper wurden auf Jod geprüft. Dabei erwies sich der erste als jodhaltig, ausserdem phosphorfrei, der zweite als jodfrei, hingegen phosphorhaltig. Durch diesen Befund war erwiesen, dass die Trennung beider Körper durch Aussalzen mittelst Ammonsulfat eine vollständige ist.

Der erstausgefällte Eiweisskörper, der seiner Menge nach den zweiten weitaus überragt, nahm wegen seines Jodgehaltes

1) E. P. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 246.

unser Interesse besonders in Anspruch, da zu vermuthen war, dass er der Träger der typischen Eigenschaften der jodhaltigen Substanz der Schilddrüse ist.

II. Darstellung des jodhaltigen Eiweisskörpers.

Die im Folgenden niedergelegten Untersuchungen sind sämmtlich an Schweinsschilddrüsen angestellt worden.

Eine grosse Schwierigkeit bot die Gewinnung klarer Organ-extracte. Nach vielem Probiren wurde folgende Darstellungsweise angewandt, welche sich als sehr zweckmässig erwies.

Die frische, von Fett und anhängendem Bindegewebe befreite Schilddrüsenmasse wird fein zerkleinert, mit Quarzsand bezw. Glaspulver im Mörtel zerstoßen, der so gewonnene Brei mehrere Male mit physiologischer Kochsalzlösung angerührt und jeweils unter Zusatz einiger Tropfen einer alkoholischen Thymollösung 12 Stunden im Eisschranke belassen. Das durch ein Tuch colirte röthliche trübe Extract wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wodurch ein Niederschlag entsteht, welcher sich nach kurzer Zeit in groben Flocken zu Boden setzt, während die Lösung über ihm sich vollkommen klärt. Dieser Niederschlag (A) wird auf einem Filter gesammelt und noch auf demselben mit einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung ausgewaschen, bis die Anfangs röthlichgraue Farbe in eine rein graue umgeschlagen ist. Alsdann wird er in Wasser gelöst, die trübe Lösung mit einigen Tropfen einer alkoholischen Thymollösung versetzt, auf zahlreiche Faltenfilter vertheilt und das Anfangs trübe Filtrat so oft auf die Filter zurückgegossen, bis es klar abfließt. Um das Filtriren grösserer Mengen, welches einige Tage erfordert, zu beschleunigen, ist es rathsam, die Filter täglich zu erneuern, da deren Poren durch die in der Flüssigkeit suspendirten Gewebstrümmer verstopft werden. Das Filtrat stellt eine absolut klare, wie Blutserum aussehende Lösung dar.¹⁾ Dieselbe wird wiederum mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wobei sich ein schneeweisser Niederschlag ausscheidet, welcher, sobald er sich in groben Flocken zusammengeballt hat, auf einem Seidenfilter gesammelt wird. Der so gewonnene reichliche, Ammonsulfat enthaltende

1) Es ist unumgänglich nothwendig, dass die Filtrate klar erhalten werden, da sonst ungelöste Zellbestandtheile mit Resten des zweiten phosphorhaltigen Eiweisskörpers in der Lösung suspendirt bleiben. Ich habe die Erfahrung gemacht, dass es am leichtesten gelingt, klare Filtrate zu erhalten, wenn man nach obiger Angabe das Filtriren erst dann vornimmt, wenn die Eiweisskörper schon einmal die Fällung mit Ammonsulfat durchgemacht haben.

Körper, welcher jodhaltig ist, wird in Wasser gelöst, die Lösung so lange der Dialyse unterworfen, bis das Dialysat auf Zusatz von Chlorbaryum keine Trübung mehr zeigt, alsdann mit 96%igem Alkohol versetzt und der gebildete Niederschlag auf einem Seidenfilter gesammelt.

Wurde der durch Halbsättigung mit Ammonsulfat erhaltene Niederschlag (A) in Wasser gelöst und die Lösung mit schwacher Essigsäure versetzt, so entstand ein Niederschlag, der ebenfalls jodhaltig war. Die Eigenschaft des Jodkörpers, mit Essigsäure zu fallen, wurde zur Herstellung desselben in grösserer Menge verwendet, wobei folgendes Verfahren benutzt wurde.

Zu dem klar filtrirten Drüsenextract wird so lange verdünnte Essigsäure zugesetzt, bis der ausgeschiedene Niederschlag flockig wird, dann einige Zeit stehen gelassen. Der auf einem Seidenfilter gesammelte Niederschlag wird hierauf behufs Reinigung in einem grossen Volumen stark verdünnten Alkalis (1 Th. NaOH auf 1000 Th. Wasser) gelöst und abermals durch Zusatz verdünnter Essigsäure gefällt. Nach wiederholtem Auswaschen mit angesäuertem Wasser und Decantiren wird der Körper auf einem Seidenfilter gesammelt und getrocknet.

III. Eigenschaften und Zusammensetzung des Jodeiweisskörpers.

Die beiden nach den soeben beschriebenen zwei Methoden gewonnenen Produkte stimmen in ihren Eigenschaften vollkommen überein.

Der Jodeiweisskörper ist in salzfreiem Wasser sehr schwer löslich, löst sich aber auf Zusatz von Neutralsalzen, noch leichter aber in verdünnten Alkalien. Durch Zusatz sehr wenig verdünnter Essigsäure resp. Salzsäure wird die salzfreie, trübe Lösung geklärt; bei weiterem Zusatz der Säure bildet sich ein Niederschlag, der im Ueberschuss der Säure sich wieder löst. Durch Sättigung mit Kochsalz wird die neutrale wässrige Lösung trübe, ohne dass sich jedoch ein Niederschlag bildet. Durch bis zur Sättigung eingetragenes Magnesiumsulfat wird der Körper aus seiner Lösung gefällt, ebenso, wie schon bemerkt, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Durch Verdünnung der salzhaltigen Lösung mit destillirtem Wasser auf das Zehnfache tritt nur schwache Trübung ein, die sich bei nachherigem Durchleiten von Kohlensäure nur wenig verstärkt.

Das Verhalten gegenüber den genannten Salzlösungen zeigt,

dass wir es mit einem Eiweisskörper zu thun haben, der die äusseren Eigenschaften der Globuline besitzt; derselbe sei der Kürze halber als Thyreoglobulin¹⁾ bezeichnet.

Ein von den übrigen Globulinen abweichendes Verhalten zeigt das Thyreoglobulin insofern, als es aus seinen mässig salzhaltigen Lösungen durch Zusatz verdünnter Säuren ausgefällt wird, ein Verhalten, welches es mit dem Myosin, das auch die übrigen Eigenschaften eines Globulins besitzt, gemeinsam hat, während Eier- oder Serumglobulin unter gleichen Verhältnissen in Neutralsalzlösung gelöst bleibt.

Man begegnet ab und zu in der Litteratur für das Colloid der Schilddrüse, welches zum grössten Theil aus Thyreoglobulin besteht, der Bezeichnung Pseudomucin. Ein Pseudomucin ist jedoch das Thyreoglobulin nicht, da die Pseudomucine durch Säuren nicht gefällt werden (Hammarsten).

Das Thyreoglobulin wird durch Schwefel- bzw. Salpetersäure gefällt; im Ueberschuss der Säuren ist es unlöslich. Ferner wird es gefällt durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Ferrocyankalium und Essigsäure, Jodquecksilberkalium, Trichloressigsäure und Kupfersulfat.

Die üblichen Farbenreactionen der Eiweisskörper fallen alle positiv aus: so die Probe mit Millon's Reagens, die Probe nach Adamkiewicz, nach Molisch, die Biuret- und die Xanthoproteinreaction.

Die salzfreie Lösung des Thyreoglobulins trübt sich beim Sieden; es tritt aber keine echte Coagulation ein. Enthält die Lösung 10% Magnesiumsulfat, so gerinnt das Thyreoglobulin bei 65°.

Das Thyreoglobulin enthält bleischwärenden Schwefel.

¹⁾ Diese Benennung sei derjenigen Hutchison's, welcher den durch Essigsäure gefällten Körper Colloid nennt, vorgezogen, da letztere Bezeichnung keinen chemischen Begriff involvirt, der Begriff «Colloid» in der pathologischen Anatomie sich überhaupt auf sowohl chemisch wie functionell verschiedene Substanzen erstreckt (Colloid der Ovarien, colloide Entartung der Nieren, Colloid der Schilddrüsen u. s. w.) und der im pathologischen Sinne als Colloid bezeichnete Körper, wie wir später sehen werden, gleichwie das Hutchison'sche Colloid, ein Gemenge zweier Eiweisskörper darstellt.

Der starke Ausfall der Reaction nach Molisch lässt auf das Vorhandensein von viel Kohlehydrat schliessen. Ein bemerkenswerthes Verhalten bietet die Bindungsweise der Kohlehydratgruppe mit dem Eiweissmolekül insofern, als nach zwei-stündigem Kochen des Thyreoglobulins mit 5%iger Salzsäure sämtliches Kohlehydrat abgespalten wird. Der Rückstand gibt keine Rothfärbung mehr mit α -Naphthol und Schwefelsäure, während die Lösung dadurch intensiv roth gefärbt wird und deutlich ammoniakalische Silberoxyd- und Fehling'sche Lösung reducirt. Es wurde der Versuch gemacht, das leicht abspaltbare Kohlehydrat in Form seines Osazons zu charakterisiren. Zu diesem Zweck wurde folgender Weg eingeschlagen: 5 gr. Thyreoglobulin wurden zwei Stunden mit ca. 100 ccm. 5%iger Salzsäure unter Rückflusskühlung auf dem Sandbade erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, der gebildete Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat mit Bleiacetat versetzt, der Niederschlag wiederum abfiltrirt, das saure, überschüssiges Bleiacetat enthaltende Filtrat mit Ammoniak alkalisch gemacht, die dadurch entstandene Fällung abfiltrirt, mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, schliesslich vom Filter mit Wasser in ein Becherglas gespült. Nach Entbleiung mittelst Schwefelwasserstoffs gab das Filtrat intensive Rothfärbung mit Molisch's Reagens und reducirte stark Fehling'sche Lösung sowie ammoniakalisches Silberoxyd, mit Phloroglucin und Salzsäure gab es eine Braunfärbung. Es lag somit keine Pentose vor. Die bis auf wenige Cubikcentimeter eingeengte Lösung wurde mit Phenylhydrazin und einigen Tropfen Essigsäure versetzt, eine Stunde im kochenden Wasserbade belassen, alsdann im Wasserbade langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. Es kam zur Ausscheidung eines schön krystallisirten Osazons. Die Menge war jedoch zu gering, um zur Feststellung des Schmelzpunktes hinzureichen. Die Eigenschaften dieses Osazons, sowie das sonstige Verhalten der Kohlehydratgruppe im Thyreoglobulin soll übrigens noch in einer späteren Mittheilung zur Sprache kommen.

Die Thatsache, dass durch Kochen des Thyreoglobulins mit verdünnter Säure eine reducirende Lösung erhalten wird,

stimmt mit der Angabe von Notkin¹⁾ überein, welcher aus seinem Thyreoproteid (aus Hammels-, Kalbs-, Ochsen- und Schweinschilddrüsen) eine reducirende Lösung und daraus weiter ein Osazon darstellen konnte, das bei 160° schmilzt. Sie muss ausdrücklich gegen den negativen Befund Hutchison's²⁾ hervorgehoben werden, welcher aus seinem Colloid (aus Hammelschilddrüsen) einen reducirenden Körper nicht abzuspalten vermochte. Auch Reinbach³⁾ ist es nicht gelungen, eine reducirende Substanz aus dem Colloid der Kalbsschilddrüsen zu gewinnen.

Die beiden durch Ammonsulfat resp. durch Essigsäure gewonnenen Produkte wurden zuerst bei 75°, dann bei 110° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und der Elementaranalyse unterworfen.

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt. Der Schwefel wurde nach der v. Asbóth-Düring'schen Methode,⁴⁾ mittelst Schmelzens mit Natriumsuperoxyd und Soda, das Jod theilweise nach Carius, theilweise nach der von mir früher beschriebenen, etwas modificirten Methode bestimmt. Die Methode ist folgende: Die zu untersuchende Substanz wird im Nickeltiegel in möglichst wenig Wasser gelöst, dem ein grosser Ueberschuss von Natriumhydroxyd (Natr. hydroxydatum e natrio metallico) zugesetzt ist. Zu der Lösung wird 1—2 gr. jodfreier Salpeter zugesetzt. Der so entstandene Brei wird über kleiner Flamme bis zur Trockne eingedampft, alsdann das Schmelzen möglichst rasch ausgeführt. Die abgekühlte Schmelze wird in Wasser aufgenommen, die alkalische Lösung mit Silbernitrat versetzt, hierauf mit Salpetersäure angesäuert. Das abfiltrirte Jodsilber wird in der üblichen Weise zur Wägung gebracht. Diese sehr brauchbare Methode hat gegenüber der Carius'schen den Vortheil, viel weniger Zeit zu erfordern, während andererseits, vorausgesetzt, dass das Schmelzen sehr rasch ausgeführt worden ist, keine Verluste an Jodsilber zu befürchten sind. Die nach beiden Methoden erhaltenen Werthe stimmten vollkommen überein.

Ich lasse nun die analytischen Daten folgen. Präparat I war durch Füllen mit Essigsäure, Präparat II durch dreimaliges Füllen mit gleichen Theilen gesättigter Ammonsulfatlösung gewonnen.

1) Notkin, Virchow's Arch. Suppl. zu Bd. 144.

2) Hutchison, Journ. of physiol. XX.

3) Reinbach, Centralbl. f. Chirurg., 1898, Nr. 21.

4) Düring, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 281.

Präparat I.

Substanz	CO ₂	C	% C	H ₂ O	H	% H
0,1415	0,2708	0,0738	52,19	0,0895	0,00993	7,02
0,1400	0,2661	0,0725	51,83	0,0864	0,00959	6,85
		im Mittel: 52,01			im Mittel: 6,98	

Substanz	NH ₃	N	% N
0,2926	0,0595	0,0484	16,56
0,2077	0,0420	0,0346	16,67
		im Mittel: 16,61	

Substanz	J Ag	J	% J
0,5613	0,0158	0,0085	1,511)
0,9684	0,0279	0,01505	1,55
0,9449	0,0293	0,0158	1,67
		im Mittel: 1,57	

Substanz	BaSO ₄	S	% S
0,5269	0,0757	0,0104	1,97
0,5222	0,0737	0,0101	1,98
		im Mittel: 1,95	

Substanz	Asche	% Asche
0,2917	0,0012	0,41
0,3437	0,0015	0,43
	im Mittel: 0,42	

1) Nach Carius; die übrigen Jodbestimmungen sind nach der oben beschriebenen Methode ausgeführt.

Präparat II.

Substanz	CO ₂	C	% C	H ₂ O	H	% H
0,1171	0,2224	0,0606	51,79	0,0700	0,0077	6,64
0,1436	0,2745	0,0748	52,13	0,0870	0,0096	6,73
		im Mittel:	51,96		im Mittel:	6,68

Substanz	NH ₃	N	% N
0,2000	0,0399	0,0329	16,45
0,2093	0,0422	0,0348	16,64
		im Mittel:	16,54

Substanz	J Ag	J	% J
0,7920	0,0256	0,0138	1,74
0,7382	0,0242	0,01305	1,76
		im Mittel:	1,75

Substanz	BaSO ₄	S	% S
0,6369	0,0796	0,0109	1,71
0,6680	0,0891	0,0122	1,88
		im Mittel:	1,77

Substanz	Asche	% Asche
0,2328	0,0011	0,47

Aus dem Mittel der Procentwerthe ergeben sich auf die aschefreie Substanz berechnet folgende Zahlen:

	Präparat I	Präparat II
C	52,22	52,20
H	6,96	6,70

0,1415	0,2708
0,1400	0,2661

0,0738		H ₂ O	
0,0725			H
	52,19	0,0895	0,00993
	51,83	0,0864	0,00959
im Mittel:	52,01		im Mittel:

Substanz	NH ₃	N	% N
0,2926	0,0595	0,0484	16,56
0,2077	0,0420	0,0346	16,67
		im Mittel:	16,61

Substanz	JAg	J	% J
0,5613	0,0158	0,0085	1,511)
0,9684	0,0279	0,01505	1,55
0,9449	0,0293	0,0158	1,67
		im Mittel:	1,57

Substanz	BaSO ₄	S	% S
0,5269	0,0757	0,0104	1,97
0,5222	0,0737	0,0101	1,93
		im Mittel:	1,95

Substanz	Asche	% Asche
0,2917	0,0012	0,41
0,3437	0,0015	0,43
	im Mittel:	0,42

1) Nach Ca
beschriebenen V

übrigen Jodbesti
ausgeführt.

	Präparat I	Präparat II
N	16,67	16,51
J	1,57	1,75 ¹⁾
S	1,95	1,77

Wie sich aus den analytischen Werthen ersehen lässt, stellen beide Produkte einen und denselben Körper dar, woraus wir berechtigt sind, zu schliessen, dass in der Schilddrüse nur ein jodhaltiger Eiweisskörper vorhanden ist.

Demselben kommt folgende aus obigen beiden Durchschnittswerthen erhaltene, auf aschefreie Substanz berechnete procentische Zusammensetzung zu (des Vergleichs wegen setze ich die von Bubnow²⁾ für sein Thyreoprotein II und III gefundenen Mittelwerthe als am meisten auseinandergehend daneben):

	Thyreoglobulin (vom Schwein)	Thyreoprotein II (vom Rind) Bubnow	Thyreoprotein III (vom Rind) Bubnow
C	52,21	50,20	49,27
H	6,83	6,34	6,29
N	16,59	16,10	16,68
J	1,66	—	—
S	1,86	1,34	1,40
(O)	(20,55)	(26,02)	(26,36)

Beim Vergleich des Thyreoglobulins mit den übrigen bekannten natürlich vorkommenden oder künstlich jodirten Jod-eiweisskörpern stellen sich interessante Verhältnisse heraus, welche Erwähnung verdienen. Zu den ersten gehören das

1) Die Angabe Notkin's (Virchow's Arch. Suppl. Bd. 144), dass das Jod kein integrierender Bestandtheil des durch Halbsättigung mit Ammonsulfat aus dem wässerigen Schilddrüsenextract gewonnenen Eiweisskörpers ist, sondern bloss auf einer Verunreinigung beruht und somit der Jodgehalt jenes Eiweisskörpers bis auf verschwindend kleine Mengen herabsinkt, wenn derselbe wiederholt gelöst und gefällt worden ist, habe ich, wie erwähnt, nicht bestätigen können. Die in Präparat II gefundenen Jodwerthe rühren von Präparaten her, welche 5 mal gefällt worden sind, während Notkin angibt, nach fünfmaliger Fällung bloss unwägbare Mengen Jodsilber gefunden zu haben.

2) Bubnow, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VIII, S. 1.

Spongín (Harnack)¹⁾ und das Gorgonin (Drechsel);²⁾ zu den letzteren das Eierjodalalbumin (Hofmeister)³⁾ und das Serumjodalalbumin (Kurajeff).⁴⁾ Der besseren Uebersicht halber seien die analytischen Zahlen dieser Jodeiweisskörper nachfolgend zusammengestellt:

	Thyreoglobulin	Spongín (Harnack)	Gorgonin (Drechsel)	Eierjodalalbumin (Hofmeister)	Serumjodalalbumin (Kurajeff)
C	52,21	48,51	41,54	47,92	47,57
H	6,83	6,80	5,77	6,60	6,11
N	16,59	14,79	14,49	14,27	14,56
J	1,66	1,5	7,99	8,95	12,05
S	1,86	0,73		1,26	1,13
(O)	(20,85)	(28,0)		(21,00)	(18,58)

Eine auffallende Uebereinstimmung in ihrem Jodgehalt zeigen die beiden natürlich vorkommenden Jodeiweisskörper, das Spongín und das Thyreoglobulin, wovon das eine 1,5, das andere 1,6⁰/₀ Jod enthält, während wiederum das künstlich jodirte Eieralbumin in seinem Jodgehalt dem Gorgonin nahe steht (7,79 resp. 8,95⁰/₀). Inwieweit diese Zahlen zu einem Vergleich berechtigen, lässt sich zur Zeit nicht beurtheilen. Das Molekulargewicht des Thyreoglobulins lässt sich auf Grund des Jodgehaltes auf etwa 8000 veranschlagen. Weitere Schlüsse werden erst möglich sein, wenn wir über die Spaltungsprodukte des Thyreoglobulins, vor Allem aber über die Stellung des Jods im Molekül orientirt sein werden.

IV. Das Nucleoproteid der Schilddrüse.

Wie Eingangs erwähnt, lässt sich nach Entfernung des Thyreoglobulins aus dem Extract der Schilddrüse durch Eintragen von Ammonsulfat in Substanz bis beinahe zur Sättigung ein zweiter Eiweisskörper isoliren, welcher phosphorhaltig ist,

1) Harnack, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 412.

2) Drechsel, Zeitschr. f. Biologie, Neue Folge, Bd. 15, S. 90.

3) Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 159.

4) Kurajeff, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 462 (Präparat A₃).

eine Thatsache, die bereits Notkin¹⁾ erwähnt hat. Dieses Nucleoprotein ist aber entgegen der Meinung Notkin's jodfrei. Was seine Eigenschaften anbelangt, so sei erwähnt, dass es in salzfreiem Wasser unlöslich ist, auf Zusatz von Neutralsalzen aber in Lösung geht, ebenso ist es löslich in Alkali. Durch verdünnte Säuren wird es gleich dem Thyreoglobulin gefällt.²⁾ In einer Lösung, welche 10% Magnesiumsulfat enthält, gerinnt es bei 73°. Mit α -Naphthol und concentrirter Schwefelsäure gibt es Rothfärbung, wogegen es mit Phloroglucin und Salzsäure sich braun, nicht violettroth färbt; somit enthält es eine Kohlehydratgruppe, die anscheinend nicht aus Pentosen besteht. Ausserdem enthält es Xanthinbasen. Was die Menge des Nucleoproteids in der Schilddrüse betrifft, so ist sie viel geringer, als die des Thyreoglobulins.

Behufs Analyse wurde eine grössere Menge des Nucleoproteids dargestellt. Da die durch einfaches Ausziehen mit physiologischer Kochsalzlösung erhaltenen Organextracte einen ziemlich starken Hämoglobingehalt besaßen, so wurde versucht, durch Aussalzen mittels Ammonsulfat das Hämoglobin vom Nucleoprotein zu trennen. Der Versuch scheiterte daran, dass beide Körper die gleichen Fällungsgrenzen besitzen (s. weiter oben). Es wurde deshalb versucht, die Drüsen, bevor sie zur Verarbeitung kamen, durch längeres Waschen mit Leitungswasser von Hämoglobin zu befreien, was bis zu einem gewissen Grade erreicht werden konnte, wenn die Drüsen vorher in grobe Stücke zerrissen wurden. Die Organextracte hatten allerdings immer noch einen rosafarbenen Ton. Der nach vollständiger Sättigung mit Ammonsulfat erhaltene hellrothe Niederschlag wurde in Wasser gelöst, die Lösung der Dialyse unterworfen und daraus der Eiweisskörper mit Alkohol von 95% gefällt.

1) Notkin, Virch. Arch., Suppl. Bd. 144.

2) Dieser Befund erklärt, warum durch Versetzen des Drüsenextractes ohne vorherige Trennung der Eiweisskörper Hutchison (loc. cit.) ein Produkt erhalten hat, das sowohl phosphor- als jodhaltig ist. Der gewonnene Niederschlag stellte ein Gemenge des Thyreoglobulins und des Nucleoproteids dar.

Einige Gramme des Eiweisskörpers wurden während sechs Tagen der Verdauung mit Pepsinsalzsäure überlassen, wobei sich ein flockiger Niederschlag bildete, der in Alkali löslich, in Säuren unlöslich war und beträchtliche Mengen Phosphor enthielt, somit ein Nuclein darstellte.

Der ursprüngliche Eiweisskörper, welcher zu den Nucleoproteiden gehört, wies als solcher einen Gehalt an Phosphor von 0,16% auf.

0,7713 gr. des Nucleoproteids gaben $0,0165 \text{ Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,001276 \text{ P} = 0,16\%$ auf.

Behufs Vergleichung des mit Hülfe der Aussalzungsmethode dargestellten Nucleoproteids mit dem Produkte, welches nach dem von Hammarsten zur Gewinnung des Nucleoproteids aus dem Pankreas beschriebenen Verfahren erhalten wird, wurde das wässerige Schilddrüsenextract gekocht, die Fällung abfiltrirt und das klare Filtrat mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt, worauf sich ein Niederschlag bildete, in welchem das reine Nucleoprotein enthalten sein sollte. Wie sich bei der Analyse herausstellte, enthält aber dieser Körper neben einer beträchtlichen Menge Phosphor auch noch Jod, ist also nicht reines Nucleoprotein, sondern ein Gemenge des letzteren mit dem Thyreoglobulin. Diese Methode ist daher zur Reingewinnung des Nucleoproteids der Schilddrüse nicht geeignet.

V. Wirkung der beiden Eiweisskörper der Schilddrüse auf den thierischen Organismus.

Es war von Interesse, zu erfahren, ob die typische Wirksamkeit, welche der ganzen Schilddrüse zukommt, auch den daraus isolirten Eiweisskörpern innewohnt, und im Falle diese Vermuthung sich bewahrheiten sollte, ob etwa der jodhaltige allein als Träger der physiologischen Wirksamkeit anzusehen ist.

Als Kriterium für die Wirksamkeit der Eiweisskörper wurde nicht, wie vielfach in ähnlichen Fällen, das Verhalten thyreoidectomirter Thiere nach Einverleibung des Präparates gewählt, da diese Versuchsanordnung wegen der Unregelmässigkeit, mit der die Symptome der Tetanie auftreten, nur bei Anwendung

sehr langer Versuchsreihen einwandfreie Beweise für resp. gegen die Wirksamkeit eines Präparates zu liefern im Stande ist.

Begnügt man sich damit, an der Hand weniger Versuche die Wirksamkeit eines Präparates daraus zu entnehmen, dass etwa nach Einverleibung desselben ein Tetanieanfall zurückgeht, dann ist der Einwand berechtigt, dass einerseits die Anfälle auch ohne Medication vorübergehen, andererseits aber des öfteren die Medication gar keinen Einfluss ausübt. Nur eine sehr grosse Anzahl von Versuchen kann in dem einen oder dem andern Sinne Entscheidung bringen. Im übrigen sei bei dieser Gelegenheit noch auf eine Angabe aufmerksam gemacht, wonach thyreoidectomirte Thiere, welche mit der getrockneten Schilddrüsensubstanz in toto (Schilddrüsentabletten) gefüttert wurden, in relativ kurzer Zeit sämmtlich zu Grunde gingen (Pugliese).¹⁾ Sollten diese Versuche Bestätigung finden, so würde sich daraus ergeben, dass die Möglichkeit, aus der Schilddrüse ein die Drüsen auf die Dauer ersetzendes Produkt zu gewinnen, überhaupt nicht gegeben ist, dass somit die tetanischen Anfälle, bezw. die chronische Cachexie und der Tod stets früher oder später die Folge der Thyreoidectomie sein werden. Diese Thatsache würde auch eine Erklärung dafür abgeben, dass das Jodothyryl die Tetanie und den Tod auf die Dauer doch nicht zu verhindern im Stande ist (vergl. darüber u. A. Baumann und Goldmann, Münch. med. Wochenschr., 1896, Nr. 47). Damit kämen wir aber zur Annahme, dass die Wirksamkeit der Schilddrüse wenigstens zum Theil an die Integrität des Organs gebunden ist.

Als ein zuverlässiges Kriterium der Wirksamkeit der specifischen Bestandtheile der Schilddrüse ist hingegen dessen Einfluss auf den Stoffwechsel zu erachten, welcher sich darin kundgibt, dass prompt und regelmässig nach Darreichung eines im Sinne der Schilddrüse wirksamen Präparates eine bedeutende Vermehrung des Harnstickstoffes auftritt. Dieses Verfahrens hat sich Roos in ähnlichen Fällen bereits öfters mit Erfolg bedient. Auch ich habe es in Anwendung gebracht. Die Versuchsanordnung war übrigens genau die von Roos²⁾ gewählte.

Ein 11 kg. schwerer Hund wurde annähernd in Stoffwechselgleichgewicht gebracht, indem er täglich 100 gr. Hundefleisch, 500 ccm. Milch und 300 ccm. Wasser erhielt. Die Nahrungsaufnahme fand stets des Morgens statt, nachdem der Hund nach vorheriger spontan erfolgter Harnentleerung und Defäcation abgewogen worden war. In der 24stündigen

1) Pugliese, Pflüger's Archiv, Bd. 72.

2) Roos, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 11.

Harnmenge wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nachdem die tägliche Stickstoffausscheidung einige Tage auf der gleichen Höhe geblieben war (dieselbe betrug im Durchschnitt 4,52 gr.), wurde dem Thier mit der Nahrung 1 gr. Thyreoglobulin verabreicht. Der am folgenden Tage untersuchte Harn enthielt bedeutend mehr Stickstoff (6,5 gr.). Die Vermehrung betrug 54 %. Die Mehrausscheidung dauerte wie auch nach Verabreichung von ganzen Schilddrüsen oder von Jodothyryn einige Tage lang fort, sank aber allmählich auf die ursprüngliche Höhe.

Die einzelnen Zahlen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Hund A.

Ver- suchs- tage	Harn- menge	Speci- fisches Gewicht	N. Gehalt	Körper- gewicht	Einnahmen	Bemerkungen
1.	520	1016	4,9296	11 240	Täglich: 100 gr.	
2.	380	1017	4,2040	11 245	Hundekuchen,	
3.	405	1017	4,2297	11 240	500 ccm. Milch,	
4.	375	1018	4,0200	11 246	300 ccm. Wasser.	
5.	583	1014	4,6838	11 035		
6.	480	1017	4,7664	11 070		
7.	460	1016	4,8024	11 020		
8.	460	1017	4,7334	11 020		{ Mit der Nahrung 1 gr. Thyreo- globulin.
9.	530	1015	4,3799	10 952		
10.	465	1019	6,5709	10 815		
11.	450	1019	6,2117	10 720		
12.	440	1019	5,3284	10 735		
13.	350	1023	5,1466	10 810		
14.	425	1020	5,2564	10 788		
15.	400	1023	5,4478	10 730		
16.	515	1020	5,9029	10 480		
17.	270	1032	5,9832	10 390		
18.	} 380	1024	5,6848	10 350		
19.				10 356		
20.	560	1018	5,2976	10 300		

Das Thyreoglobulin übt also auf die Stickstoffausscheidung des Organismus den gleichen Einfluss aus, wie die ganze Schilddrüse.

Ein ähnlicher Versuch wurde ausgeführt mit dem zweiten aus der Thyreoidea gewonnenen Eiweisskörper, dem jodfreien Nucleoprotein.

Ein 12 kg. schwerer Hund erhielt als tägliche Nahrung 150 gr. Hundekuchen, 500 ccm. Milch und 300 ccm. Wasser. Nachdem wiederum die tägliche Stickstoffausscheidung annähernd eine constante geworden war, erhielt das Versuchsthier 1,5 gr. des Nucleoproteids verabreicht. Weder am nächsten, noch an den darauffolgenden Tagen stieg jedoch die Stickstoffausscheidung, wie die nachstehende Tabelle veranschaulicht.

Hund B.

Ver- suchs- tage	Harn- menge	Speci- fisches Gewicht	N- Gehalt	Körper- gewicht	Einnahmen	Bemerkungen
1.	620	1014	5,4498	12 420	Täglich: 150 gr.	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> <div>mit der Nahrung 1,5 gr. Nucleo- albumin der Schilddrüse.</div> </div>
2.	600	1017	5,6688	12 420	Hundekuchen,	
3.	580	1016	5,9508	12 400	500 ccm. Milch,	
4.	660	1018	5,7552	12 280	300 ccm. Wasser.	
5.	640	1015	5,6288	12 230		
6.	632	1015	6,1244	12 240		
7.	657	1014	5,9537	12 275		
8.	645	1014	5,8566	12 290		
9.	635	1013	5,7404	12 300		

Dem aus der Schilddrüse gewonnenen jodfreien Eiweisskörper, dem Nucleoproteid, kommt also die typische Wirkung der Schilddrüse auf die Stickstoffausscheidung in keinerlei Weise zu.

Wir ersehen aus diesen Thatsachen, dass einzig und allein das jodhaltige Thyreoglobulin der Träger der specifischen Wirksamkeit der Schilddrüse auf den Stoffwechsel ist.

VI. Spaltungsprodukte des Thyreoglobulins und Beziehungen desselben zum Jodothyryn.

A. Spaltung durch Pepsinverdauung.

In der Absicht, möglichst hochstehende Spaltungsproducte zu erhalten, wurde das Verhalten des Thyreoglobulins gegenüber der Pepsinverdauung geprüft.

5 gr. trockenen, pulverisirten Thyreoglobulins wurden mit 100 ccm. verdünnter Salzsäure (2,5 Theile HCl auf 1000 Theile Wasser) versetzt und bei 35° 4 Wochen lang der Ver-

daung überlassen. Die Anfangs trübe Lösung klärte sich bald unter Ausscheidung eines nicht unbeträchtlichen graubraunen flockigen Niederschlages, der sich zu Boden setzte und auch nach 4wöchentlicher Verdauung sich nicht mehr veränderte. Nach genannter Zeit wurde der Niederschlag abfiltrirt, mit 0,25% HCl ausgewaschen, bis das Filtrat die Biuretreaction nicht mehr gab. Der in Wasser und Säuren (Essigsäure und Salzsäure) unlösliche, dagegen in Alkaliën leicht lösliche Niederschlag zeigte negativen Ausfall der Biuretreaction, der Probe mit Millon's und mit Molisch's Reagens, hingegen positiven Ausfall der Xanthoproteinreaction. Ferner entwickelte er beim Schmelzen Skatol- und Indolgeruch, wurde durch Phosphorwolframsäure gefällt und enthielt 5,27% Jod.

0,1503 gr. Substanz gaben $0,0147 \text{ AgJ} = 0,00793 \text{ J} = 5,27\% \text{ J}$.

Der Körper, welcher, wie das Fehlen der Biuretreaction zeigt, nicht mehr die Eigenschaften eines Eiweisskörpers besitzt, steht dadurch in naher Beziehung zum Jodothyryn, ist aber in Anbetracht seines Jodgehaltes (das aus dem Thyreoglobulin gewonnene Jodothyryn ist bedeutend reicher an Jod, s. S. 45) nicht identisch mit demselben.

Schon Hutchison¹⁾ ist es gelungen, aus dem durch Ausziehen der Schilddrüse mit verdünntem Alkali und nachherigem Füllen mit Essigsäure erhaltenen Produkt durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure einen Körper zu gewinnen, der keine Biuretreaction mehr zeigte (proteidfrier Körper Hutchison's). Derselbe wurde aber phosphorhaltig (0,8%) und relativ jodarm (0,7%) befunden. Dieser Phosphorgehalt rührt vermuthlich daher, dass Hutchison bei seinem Verfahren zur Darstellung des Colloids durch Ausziehen mit verdünntem Alkali sowohl das Thyreoglobulin wie das Nucleoproteid mit in Lösung bekam, worauf dann beide durch Essigsäure gefällt wurden. Der Verdauungsrückstand des Colloids bestand alsdann aus einem Nuclein und dem jodhaltigen Körper. Dadurch lassen sich die Anwesenheit des Phosphors und der relativ niedrige Jodgehalt erklären. Die gleichen Betrachtungen gelten

1) Hutchison, Journ. of physiol. XX, Nr. 6, 1896.

auch bezüglich der Angaben Tambach's,¹⁾ welcher in dem Pepsinverdauungsrückstand der Eiweissstoffe der Schilddrüse bloss 0,21 % Jod fand.

In dem von dem unlöslichen Verdauungsrückstand getrennten Filtrat wurden nach einem von Herrn Dr. E. P. Pick im hiesigen Laboratorium ausgearbeiteten Verfahren die Albumosen und die Peptone getrennt. In Betreff der Einzelheiten des Verfahrens, sowie deren näherer Begründung, verweise ich auf die in Aussicht stehende Publication.

Die vorerst mit Alkali neutralisirte, dann ziemlich stark eingeeengte Verdauungslösung wurde mit der zehnfachen Menge 96 %igen Alkohols versetzt, wodurch die Protalbumose und die grösste Masse der Deuteroalbumosen und Pepton B in Lösung blieb, die Heteroalbumose und Pepton A dagegen in weissen Flocken, die sich bald zu einer klebrigen Masse zusammenballten, ausgeschieden wurden. Der Niederschlag enthielt nur Spuren von Jod.

Die alkoholische Lösung wurde zur Syrupconsistenz eingeeengt, alsdann in Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, wobei die Protalbumose ausfiel. Dieselbe wurde abfiltrirt, sie erwies sich als stark jodhaltig. Das Filtrat wurde mit dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Die ausgeschiedene Deuteroalbumose A erwies sich wiederum als jodhaltig. Ebenso die durch vollständige Sättigung mit Ammonsulfat gewonnene Deuteroalbumose B und die durch nachherigen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure erhaltene Deuteroalbumose C. Das durch Einengen der Lösung erhaltene Pepton B enthielt dagegen nicht viel Jod. Quantitative Jodbestimmungen konnten der geringen Menge der Substanzen wegen nicht ausgeführt werden. Doch ist anzunehmen, dass die Spuren von Jod in der Heteroalbumose und dem Pepton A wohl nur auf Verunreinigung mit den alkohollöslichen Albumosen zu beziehen sind, dass dagegen die Protalbumose und die Deuteroalbumosen Jod in beträchtlicher, das

1) Tambach, loc. cit., S. 558 u. ff.

Pepton B wiederum nur in geringer Menge enthalten. Das Jod ist somit in den durch Pepsinsalzsäure erhaltenen Zersetzungsprodukten ungleichmässig vertheilt.

In welcher Beziehung die einzelnen Albumosen und Peptone genetisch zu einander stehen, ist gegenwärtig noch Gegenstand der Untersuchung seitens des Herrn Dr. E. P. Pick. Je nach dem Ergebniss dieser Versuche wird sich auch für obiges Resultat eine Deutung ergeben. Vorläufig spricht das Fehlen des Jods in der Heteroalbumose und sein Vorkommen in der Protalbumose und den Deuteroalbumosen dafür, dass diese aus einander oder aus demselben jodhaltigen Complex des ursprünglichen Eiweissmoleküls, aber nicht aus der Heteroalbumose hervorgehen.

B. Spaltung durch Trypsinverdauung.

7 gr. Thyreoglobulin wurden mit ca. 120 ccm. verdünnter Sodalösung (2 Th. Soda : 1000 Th. Wasser) und etwas Trypsin versetzt und bei 35° vier Wochen der Verdauung überlassen. Die klare Lösung gab nach jener Zeit nur noch eine unbedeutende Trübung auf Zusatz von Ammonsulfat. Essigsäure, bis zur schwach sauren Reaktion zugesetzt, erzeugte keinen Niederschlag, der Jodothyrimcomplex war somit durch die Trypsinverdauung zerstört worden. Die Lösung enthielt weder Jod als solches, noch in Jodidform.

Die neutralisirte Lösung wurde eingeeengt, wonach sich reichlich Tyrosinkristalle in charakteristischer Form ausschieden. Dieselben wurden abfiltrirt, aus ammoniakalischem Alkohol umkrystallisirt und mittelst des Millon'schen Reagens und der Probe nach Piria identificirt. Nach weiterer Einengung schieden sich Leucinkugeln aus.

Aus der Thatsache, dass bei Trypsinverdauung Tyrosin in reichlicher Menge ohne vorhergehende Jodabspaltung gebildet wird, lässt sich schliessen, dass das Jod im Thyreoglobulin nicht — wie für das künstlich jodirte Jodalbumin schon verschiedentlich angenommen worden ist — an die Tyrosin-Gruppe gebunden ist. Allerdings bleibt der Einwand möglich, dass, da das Thyreoglobulin in weitaus geringerer Menge Jod

enthält als das Eierjodalbumin (etwa $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{8}$), das Jod im ersteren nur an einen Theil der vorhandenen Tyrosingruppen gebunden, der grössere Theil der Tyrosincomplexe aber davon frei ist. Die Annahme mehrerer Tyrosingruppen im Eiweissmolekül erscheint allerdings durch keine Thatsache begründet.

Uebrigens zeigt das künstlich jodirte Eiweiss ein gleiches Verhalten. Einige Gramm künstlich jodirten Eialbumins (ca. 9% Jod) wurden durch mehrstündiges Kochen mit concentrirter Salzsäure zersetzt. Aus der eingedampften Lösung schieden sich nach dem Abkühlen reichlich Tyrosinkrystalle aus. Auf Grund dieses Befundes scheint der Schluss berechtigt, dass das Jod auch im Jodalbumin nicht an die Tyrosin-Gruppe gebunden ist.

Von den übrigen Produkten des durch Trypsin gespaltenen Thyreoglobulins soll in einer späteren Mittheilung des Näheren die Rede sein.

C. Spaltung mit verdünnten Säuren.

Das Thyreoglobulin wurde nun auf das Verhalten gegenüber verdünnten Säuren geprüft. Um ein mit dem Baumann'schen Jodothyryn vergleichbares Object zu erhalten, wurde zuerst 10%ige Schwefelsäure gewählt.

14 gr. Thyreoglobulin wurden 5 Stunden mit 80 ccm. 10%iger Schwefelsäure unter Rückflusskühlung auf dem Sandbade erhitzt. Dabei schied sich ein feinflockiger brauner Niederschlag aus, während die Lösung eine braune Farbe annahm. Der Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und mit Wasser so lange ausgewaschen, bis das Filtrat schwefelsäurefrei war, sodann der noch feuchte Rückstand so lange mit Alkohol von 96% ausgekocht, bis letzterer sich bei dieser Procedur nicht mehr braun färbte. Die alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingengt und der Rückstand bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Dieser Körper stellte ein braunes Pulver dar, welches in Wasser und Säuren unlöslich, in Alkalien leicht löslich war. Es gab keine Biuretreaction, keine Reaction mit Millon's und Molisch's Reagens, dagegen Xanthoproteinreaction, war fällbar durch

Phosphorwolframsäure und enthielt viel Jod, stimmte somit nach seiner Darstellungsweise und seinen Eigenschaften mit dem Baumann'schen Jodothyrin überein. Aus den 14 gr. Thyreoglobulin wurden 0,18 Jodothyrin gewonnen, was einer Ausbeute von 1,3% gleich kommt.

0,0842 gr. des so erhaltenen Jodothyrins gaben 0,0223 AgJ = 0,0113 J = **14,29%** Jod.

Dieser hoher Jodgehalt ist bisher noch in keinem Jodothyrinpräparat gefunden worden.¹⁾ Um zu erfahren, ob er ein constanter sei, habe ich eine zweite Portion Thyreoglobulin anstatt mit Schwefelsäure, mit 10%iger Salzsäure zersetzt. Dabei erhielt ich ein hellgrau gefärbtes Produkt (während das durch Schwefelsäurespaltung gewonnene stets dunkelbraun ist), das den gleichen Jodgehalt aufwies.

10 gr. Thyreoglobulin wurden mit 10%iger Salzsäure 4 Stunden auf dem Sandbade unter Rückflusskühlung im Sieden erhalten. Aus dem gebildeten Niederschlag, welcher eine viel hellere Farbe besitzt als bei Anwendung von Schwefelsäure, wurde nach der üblichen Weise Jodothyrin gewonnen.

0,0693 gr. Jodothyrin gaben 0,0186 AgJ = 0,01003 J = **14,48%** Jod.

Der im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen viel höher gefundene Jodgehalt des Jodothyrins lässt sich dadurch erklären, dass bei der oben geschilderten Darstellungsweise das Ausgangsmaterial ein einheitlicher, von fremden Beimengungen freier Körper ist, während nach der üblichen Methode von der Schilddrüse als solcher ausgegangen wird. Bereits Baumann hat die Vermuthung ausgesprochen, dass das vollkommen reine Jodothyrin einen höheren Jodgehalt besitze als den von ihm zuerst gefundenen (9,3%). Die Vermuthung Baumann's hat sich sonach bestätigt. Auch seine Meinung, dass der Phosphorgehalt des Jodothyrins sich auf Beimengung fremder Bestandtheile zurückführen lässt, hat sich als richtig erwiesen, indem das vorliegende möglichst reine Jodothyrin (als solches glaube ich berechtigt zu sein, das aus dem Thyreoglobulin erhaltene Produkt anzusehen) keinen

¹⁾ Vergleiche: Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 323; Roos, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 3 u. ff.

Phosphor enthält. Wahrscheinlich sind die von den Autoren gefundenen Schwankungen im Jodgehalt des Jodothyryns darauf zu beziehen, dass die von den übrigen Bestandtheilen der Schilddrüse herrührenden Beimengungen jeweils in verschiedener Menge vorhanden waren.

Ich war in der Lage, dieses Jodothyryn mit einem aus künstlich jodirtem Eiereiweiss durch ähnliche Behandlung mit 10⁰/oiger Schwefelsäure erhaltenen Produkt zu vergleichen. Wie aus dem Thyreoglobulin, so entsteht auch aus dem Jodeieralbumin durch die Säurebehandlung ein alkohollöslicher und ein alkoholunlöslicher Theil, welche beide jodhaltig sind. Eine weitere Aehnlichkeit zeigen die beiden aus Thyreoglobulin resp. aus Jodeieralbumin gewonnenen Produkte darin, dass der bei der Säurespaltung entstandene Niederschlag bei fortgesetztem Kochen mit Säure wiederum anfängt in Lösung zu gehen. Bei der Bestimmung des Jods hat sich herausgestellt, dass das Säurespaltungsprodukt aus Jodeieralbumin einen demjenigen des Jodothyryns ziemlich nahe kommenden Jodgehalt besitzt (ca. 12⁰/o). Auf die Aehnlichkeit beider Körper in ihrem Verhalten und in ihrem Jodgehalt, welche ein theoretisches Interesse beansprucht, soll hier nur hingewiesen werden. In physiologischer Beziehung ist hinlänglich bekannt, dass dem aus Jodalbunin erhaltenen Produkt die physiologische Wirksamkeit des Jodothyryns in keinerlei Weise zukommt.

Hervorgehoben sei noch, dass, wenn man die von dem beim Kochen sich bildenden Rückstand abfiltrirte Lösung (d. h. die 10⁰/oige Schwefelsäure, welche die löslichen Spaltungsprodukte des Thyreoglobulins enthält und starke Biuretreaction gibt) noch weiter kocht, sich kein weiterer Niederschlag mehr ausscheidet, trotzdem die Albumosen Jod enthalten. Ob man daraus schliessen darf, dass das Jod hier in anderer Bindung als im Jodothyryn und in diesem wieder in anderer Bindung als im alkoholunlöslichen Theil des Niederschlags vorkommt, ist vorläufig nicht zu entscheiden.

D. Spaltung mit concentrirten Säuren.

Endlich wurde das Thyreoglobulin durch Kochen mit

concentrirter Salzsäure in seine Bestandtheile zerlegt. 5 gr. Thyreoglobulin wurden mit etwa der 10fachen Menge concentrirter Salzsäure unter Rückflusskühlung 5 Stunden auf dem Sandbade im Sieden erhalten. Nach dieser Zeit gab die Lösung die Biuretreaction nicht mehr. Durch Einengen auf dem Wasserbade wurde der grösste Theil der Salzsäure verjagt, sodann der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Phosphorwolframsäure versetzt, wobei ein starker Niederschlag entstand. Derselbe wurde abfiltrirt, mit schwefelsäurehaltigem Wasser so lange ausgewaschen, bis das Filtrat keine Chlorreaction mehr gab, alsdann in Wasser aufgenommen, gekocht, wobei sich ein Theil löste, und die Lösung heiss filtrirt. Beim Abkühlen schieden sich Krystalle aus, welche sich beim Veraschen als jodhaltig erwiesen. Die Menge des darin gefundenen Jods betrug jedoch nur höchstens einige Procente der in dem verarbeiteten Thyreoglobulin vorhandenen Jodmenge. Durch die Einwirkung der siedenden Salzsäure wurde der grösste Theil des Jods in Freiheit gesetzt, ähnlich wie bei der Zersetzung des Gorgonins durch kochende Salzsäure (Drechsel.¹⁾) Die Lösung des zersetzten Thyreoglobulins enthielt in der That viel Jod in Jodidform; freies Jod war darin nicht nachzuweisen.

Das vom Phosphorwolframsäureniederschlag getrennte Filtrat wurde bis zur bleibenden Alkalescenz mit Baryumhydroxyd versetzt, der gebildete Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat mit Schwefelsäure neutralisirt und das ausgeschiedene Baryumsulfat abfiltrirt.

Das klare Filtrat wurde mit Quecksilberacetatlösung im Ueberschuss versetzt. Es entstand ein weisser, flockiger Niederschlag, welcher abfiltrirt und darauf in Wasser aufgenommen wurde. Nachdem er durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt und der gebildete Niederschlag abfiltrirt worden war, wurde die Lösung bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit rauchender Salzsäure versetzt, dabei schieden sich Krystalle von salzsaurer Glutaminsäure aus.

¹⁾ Drechsel, Zeitschr. f. Biologie, Bd. XV, Neue Folge, S. 90 (1895).

Die Quecksilberacetat enthaltende Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, der gebildete Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat eingengt, das überschüssige Baryum mit Schwefelsäure, die Salzsäure mit Silberoxyd entfernt und schliesslich die Lösung eingengt. Dabei schied sich Tyrosin und Leucin aus, welche beide aus ammoniakalischem Alkohol umkrystallisirt wurden.

Wie bei der Trypsinverdauung konnte auch durch Zersetzung mit Salzsäure Tyrosin gewonnen werden, wonach, wie schon bemerkt, der Schluss berechtigt erscheint, dass das Jod nicht an die Tyrosingruppe gebunden ist. Die durch Spaltung mit Säuren sowohl, als mit Alkalien erhaltenen weiteren Produkte sind noch Gegenstand der Untersuchung.

Stellen wir uns zum Schluss noch die Frage, in welcher Beziehung die aus der Schilddrüse dargestellten Eiweisskörper zu dem von den Anatomen als Schilddrüsencolloid bezeichneten Körper stehen, so wird die Antwort folgende sein:

Der wirksame Körper der Schilddrüse, das Thyreoglobulin, enthält einzig und allein das Jod: der Gehalt der Schilddrüse an Jod steigt, wie früher schon festgestellt,¹⁾ mit deren Colloidreichthum, woraus sich ergibt, dass das Thyreoglobulin im Colloid enthalten ist. Nun musste noch ermittelt werden, ob ausserdem im Colloid noch der zweite aus der Schilddrüse gewonnene Eiweisskörper, das Nucleoproteid, vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurde das Colloid aus in ca. 70%igem Alkohol gehärteten Schweinsschilddrüsen mechanisch isolirt und auf Phosphor untersucht. Die Probe fiel stark positiv aus.²⁾ Das Colloid enthält also auch das Nucleoproteid. Wir sind somit berechtigt, zu erklären, dass der im anatomischen Sinne als Schilddrüsencolloid bezeichnete Körper ein Gemenge von Thyreoglobulin und Nucleoproteid darstellt.

1) Oswald, l. c.

2) Zum Ueberfluss wurde dieses Colloid noch auf Jod untersucht. Es erwies sich als jodhaltig.

Somit dürfte der Beweis, dass der von den Anatomen als Colloid bezeichnete Körper das wirksame Secret der Schilddrüse ist, bis zu Ende geführt sein. Da nun das Colloid erwiesenermassen (Langendorff,¹⁾ Biondi,²⁾ und namentlich Hürthle³⁾ durch die Lymphbahnen in den Kreislauf, also in den allgemeinen Stoffwechsel übergeht, so sind wir auch berechtigt anzunehmen, dass die Thyreoidea ein im Sinne der übrigen Drüsen thätiges Organ ist, nur mit dem Unterschied, dass sie ihr Secret, anstatt durch einen ad hoc vorhandenen Ausführungsgang, durch die Lymphbahnen abgibt.

Es liegt daher kein Grund vor zur Behauptung, dass der Einfluss, den die Schilddrüse auf den allgemeinen Stoffwechsel äussert, lediglich durch in der Drüse selbst sich abspielende Vorgänge (ihren intraglandulären Stoffwechsel) bedingt sei.

In einer demnächst folgenden Mittheilung soll über die Stellung des Jods in dem Thyreoglobulin sowohl, wie in dem künstlich jodirten Albumin, über die Zersetzungsprodukte der Jodeiweisskörper, des Thyreoglobulins und des Jodothyryns ausführlicher die Rede sein. Dabei soll auch die Beziehung des aus der normalen Schilddrüse des Menschen gewonnenen Thyreoglobulins zu dem aus Kröpfen dargestellten Präparat erörtert werden.

Nachtrag bei der Correctur. Zur Ergänzung der oben mitgetheilten Versuche über die physiologische Wirksamkeit des Thyreoglobulins sei erwähnt, dass dasselbe auch in einem Falle von Myxoedem sich als wirksam erwiesen hat. Herr Privatdocent Dr. Magnus-Levy, welcher die einschlägigen Versuche angestellt hat, wird über dieselben seiner Zeit ausführlicher berichten.

1) Langendorff, Arch. f. Anat. u. Phys. 1889. Supplement, S. 219.

2) Biondi, Berl. Klin. Woch. 1888.

3) Hürthle, Pflüger's Arch. Bd. 56, S. 1.

Ueber die Leukomatine des Ochsengehirns.

Von

Wl. Gulewitsch.

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der Kaiserlichen Universität zu Moskau.)

(Der Redaction zugegangen am 8. Februar 1899.)

Wenn es auch an Angaben über die sogenannten Extractivstoffe des Gehirns nicht fehlt, so ist doch die Frage nach den specifischen Leukomatinen desselben bisher so gut wie gar nicht bearbeitet worden. In Anbetracht der speciellen physiologischen Thätigkeit und der eigenartigen Bestandtheile des Gehirns lässt sich aber das Vorkommen von besonderen, nur dem Gehirn eigenthümlichen Stoffwechselsprodukten und unter diesen das Auftreten specifischer Leukomatine erwarten.

Unter den sogenannten Extractivstoffen des normalen Gehirns wurden folgende gefunden: flüchtige Fettsäuren¹⁻³⁾ (Ameisensäure, Essigsäure), Milchsäure¹⁻⁵⁾ (nach Gscheidlen [l. c.] ist sie Gährungsmilchsäure, nach Thudichum [l. c.] Fleischmilchsäure), Inosit,^{2, 3, 6-8)} Glycogen,⁹⁾ Kreatin,^{2, 3, 6, 8, 10, 11)}

1) v. Bibra, Vergleich. Unters. über das Gehirn des Mensch. und der Wirbelthiere. Mannheim. 1854.

2) W. Müller, Liebig's Ann., Bd. 103, S. 134 ff.

3) H. Köhler, Arch. f. path. Anat. u. Phys. u. f. klin. Med., Bd. 41, S. 269.

4) R. Gscheidlen, Arch. f. die gesamt. Physiol., Bd. 8, S. 171.

5) L. J. W. Thudichum, Grundzüge der anatom. u. klin. Chem. Berlin. 1886. S. 186.

6) Neukomm, Ueber das Vorkommen von Leucin, Tyrosin u. s. w. im menschlichen Körper bei Krankheiten. Inaug.-Diss. Zürich. 1859. — S. bei Fremy, Encycl. chim. Paris. 1893. T. IX. sect. 2, part. 2, fasc. 2, p. 549; auch bei E. F. v. Gorup-Besanez, Lehrb. der physiol. Chem. 3. Aufl. Braunschweig. 1874. S. 698.

7) Bödecker. S. bei Fremy u. bei v. Gorup-Besanez a. a. O.

8) Gobley. S. bei Fremy. Enc. chim. Paris. 1888. T. IX., sect. 2, part. 1, p. 274.

9) S. bei Fremy, Enc. chim. Paris. 1893. T. IX. sect. 2, part. 2, fasc. 2, p. 548.

10) G. Städeler, Journ. f. prakt. Chem., Bd. 72, S. 256.

11) Lerch. S. bei Fremy u. bei v. Gorup-Besanez a. a. O.

Leucin (oder vielmehr ein niedrigeres Glied der homologen Reihe $C_{2n} H_{3n+1} NO_2$, und zwar im Ochsengehirne, nicht im Gehirne des Menschen.¹⁾ F. Hoppe-Seyler²⁾ hat die Frage aufgeworfen, ob das von W. Müller im Ochsengehirne gefundene Leucin nicht während der Untersuchung selbst entstanden sein könnte; im normalen Gehirne³⁾ soll kein Leucin vorhanden sein, wohl aber im Gehirne bei gewissen krankhaften Zuständen des Organismus.⁴⁾ Ausserdem werden angegeben: Alloxurbasen⁵⁾ [Xanthin,^{6, 7)} Hypoxanthin,^{7, 8)} Guanin,^{9, 10)} Adenin,¹⁰⁾] Harnsäure,^{1, 7, 11)} Bernsteinsäure, Glycocoll, Kreatinin, Cystin und Taurin wurden zwischen den Bestandtheilen des Gehirns von Menschen und Ochsen vermisst.¹⁾

Baumstark¹²⁾ benutzte für die Untersuchung von Extractivstoffen des Gehirns die alte Beobachtung, dass das in Aether gebrachte Gehirn sein Wasser allmählich verliert, indem in Folge einer eigenthümlichen Dialyse zwischen dem Aether und der wässerigen Flüssigkeit des Gehirns der Aether das Wasser verdrängt und die wässerige Schicht sich unterhalb der ätherischen Lösung sammelt. In der auf diese Weise gewonnenen wässerigen Flüssigkeit fand Baumstark alle Bestandtheile des Fleischextractes, unter ihnen besonders viel Xanthinkörper und Milchsäure. Ueber das Vorhandensein von den übrigen Bestandtheilen des

1) W. Müller, l. c.

2) F. Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie. Berlin. 1877—1881. S. 680.

3) Lorenz. S. bei Fremy, *Encycl. chim.*, Paris. 1893. T. IX, sect. 2. part. 2, fasc. 2, S. 591.

4) Neukomm, l. c.

5) G. Städeler, *Liebig's Ann.*, Bd. 116, S. 106.

6) Gobley, l. c.

7) Scherer, *Liebig's Ann.*, Bd. 107, S. 314.

8) H. Köhler, l. c.

9) Fremy, *Encycl. chim.*, Paris. 1893. T. IX, sect. 2, part. 2, fasc. 2, S. 548.

10) R. Neumeister, *Lehrb. der physiol. Chem.* 2. Aufl. Jena 1897, S. 475.

11) J. Horbaczewski, *Monatsh. f. Chem.*, Bd. 12, S. 231.

12) F. Baumstark, *Diese Zeitschr.*, Bd. 9, S. 145.

Fleischextractes in der aus dem Gehirn gewonnenen wässerigen Flüssigkeit finden sich in der citirten Abhandlung keine näheren Angaben; Kreatin konnte jedenfalls nicht gefunden werden.

Was das Vorkommen von Harnstoff im Gehirn betrifft, so konnte W. Müller (a. a. O.) diese Substanz aus dem Gehirn des Menschen und des Ochsen nicht isoliren. Städeler¹⁾ will Harnstoff im Hundegehirn gefunden haben, doch gibt er keine Beweise dafür, dass der von ihm isolirte Körper wirklich Harnstoff war. Nach Picard²⁾ soll das Gehirn den Harnstoff enthalten und ein Bildungsort dieses Stoffes sein, aber die Behauptung von Picard ist noch sehr zweifelhaft,³⁾ da der Verfasser weder den Harnstoff isolirt, noch die Gegenwart desselben durch die Reactionen nachgewiesen hat, sondern seine Quantität nur durch Zerlegen mit Natriumhypobromit resp. mit Millon'schem Reagens bestimmte, welche Reagenzien bekanntlich auch verschiedene andere Körper ausser dem Harnstoff zerlegen können. Das Gesagte gilt auch für die Untersuchungen von Kaufmann.⁴⁾ Somit ist meines Wissens das Vorkommen von Harnstoff im gesunden Gehirn der Säugethiere mit Sicherheit bis jetzt noch nicht nachgewiesen;⁵⁾ bei einigen krankhaften Zuständen des Organismus wurde der Harnstoff im Gehirn gefunden,⁶⁾ ferner ist diese Substanz ein normaler Bestandtheil des Gehirns von einigen Fischen.⁷⁾

Der erste Versuch zur Isolirung von spezifischen Leukomatinen des Gehirns haben Guareschi und Mosso⁸⁾ gemacht

1) G. Städeler, Journ. f. pr. Ch., Bd. 72, S. 257.

2) P. Picard, Compt. rend., Bd. 87, S. 533.

3) Vgl. auch F. Hoppe-Seyler, Physiol. Chemie. Berlin. 1877—1881, S. 681.

4) Kaufmann, Compt. rend. de la soc. de biol., 1894, S. 323.

5) Vgl. auch: Drechsel in Hermann's Handbuch der Physiologie. Leipzig. 1883. V. Bd., 1. Th., S. 578. Landois, Lehrbuch der Physiol. des Mensch. 7. Aufl. Wien u. Leipzig. 1891, S. 664.

6) Von Neukomm und von Voit, s. bei E. F. v. Gorup-Besanez, Lehrb. der physiol. Chem., 3. Aufl. Braunschweig, 1874, S. 698.

7) S. bei Fremy, Encycl. chim. Paris. 1893. T. IX, sect. 2, part. 2, fasc. 2, p. 549 et 591.

8) Vgl. Journ. f. pr. Ch., N. F., Bd. 28, S. 504.

und nach Stas-Otto's Verfahren aus 30 kg. frischen Gehirnen (die jedoch 24 Stunden nach dem Tode untersucht wurden) Ammoniak, Trimethylamin und eine ganz geringe Menge von «Ptomatinen» bekommen, deren Bildung sie zum Theil wenigstens mit der chemischen Behandlung selbst in Zusammenhang stellen. Arnold¹⁾ konnte nach demselben Verfahren in ganz frischen Hundegehirnen gar keine alkaloidähnlichen Körper finden. Auch eine Commission von italienischen Gelehrten²⁾ hat aus 3,7 kg. Ochsengehirnen nur eine geringe Menge einer Substanz isolirt, die einige Alkaloidreactionen gab.

Ueber einen weiter gehenden Versuch zur Auffindung von specifischen Leucomatinen des Gehirns berichtet Thudichum³⁾ in seinem bekannten Buche. Bei allen interessanten Angaben, welche darin enthalten sind, können leider die im Capitel: «Ueber die einfacheren Alkaloide und die Amidosäuren des Gehirns» (l. c. S. 172), sowie in dem: «Allgemeine Methoden zur Isolirung der Edukte des Gehirns» (l. c., S. 188) sich befindenden Sätze nur wenig Vertrauen erwecken, vor Allem desshalb nicht, weil der Verfasser, der bei der Kritik der Arbeiten von anderen Forschern die Möglichkeit der Bildung von künstlichen «Produkten» statt der «Edukte» betont, bei seinen eigenen Untersuchungen diesen Umstand bisweilen ganz vergisst, wie es z. B. auch bei der Untersuchung von «Alkaloiden» des Gehirns der Fall ist, wo aber gerade eine äusserste, sogar «zimperliche» (vgl. l. c., S. 218) Vorsicht alle chemischen Manipulationen leiten sollte. Dass Thudichum diese Vorsicht nicht immer anwendet, kann man aus der Beschreibung der von diesem Autor ausgeführten Untersuchung der Leukomatine des Gehirns vom Beginn der Darstellung an ersehen. Die Discussion der specifischen Leukomatine, die Thudichum aus dem Gehirn isolirt haben will, kann ich umgehen, nicht nur weil jede Garantie für das Vorkommen dieser Stoffe als präformirter

¹⁾ Vgl. Maly's Jhrsb., Bd. 14, S. 535.

²⁾ Vgl. *ibid.*, Bd. 16, S. 525.

³⁾ L. J. W. Thudichum, Grundzüge der anatom. u. klin. Chemie, Berlin, 1886.

Bestandtheile des Gehirns fehlt, sondern weil es auch durchaus nicht bewiesen ist, dass dieselben chemische Individuen sind. Es mag genügen, anzudeuten, dass einem von dem Verfasser analysirten Golddoppelsalze mehr als die Hälfte, nämlich 16,164%(!), einem anderen sogar 24,658%(!) reducirtes Gold beigemischt waren;¹⁾ es musste doch eine gewaltige Menge von verschiedenartigsten Beimischungen in diesen analysirten . . . Verbindungen gewesen sein! Welchen Werth die auf Grund von solchen Analysen gezogenen Formeln haben können, und ob man berechtigt ist, die schon ohnehin unnötig umfangreiche zoochemische Nomenclatur mit zwei neuen Benennungen von Substanzen, die als chemische Individuen noch nicht isolirt und nicht einmal im Zustande der annähernden Reinheit dargestellt sind, zu belasten, ist von selbst klar. Ferner hat Thudichum im Gehirn noch Hypoxanthin, Fleischmilchsäure, Bernsteinsäure, Ameisensäure, Inosit, Tyrosin, Leucin und Homologe desselben gefunden. Es ist sehr bedauernswerth, dass der Autor kein Wort darüber sagt, wie er sich überzeugt hat, dass Bernsteinsäure, Tyrosin und Homologe von Leucin, welche vor Thudichum im normalen Gehirn noch nicht gefunden waren, darin wirklich präformirt enthalten sind; ich möchte daran erinnern, dass Stöckly²⁾ die Bernsteinsäure nur als Resultat einer postmortalen Veränderung der Zusammensetzung von Gehirn finden konnte; Tyrosin fehlt bekanntlich fast vollständig im normalen Organismus. Ob Thudichum den Harnstoff für einen Bestandtheil des Gehirns hält, kann ich nicht behaupten, da der Verfasser bei seiner Beschreibung der Untersuchung vom wässerigen Extracte des Gehirns diesen Stoff unter den gefundenen Bestandtheilen nicht anführt und ihn nur in dem Schema der Untersuchung erwähnt (l. c., S. 196), indem er

1) So kolossale Mengen von reducirtem Gold sollen nicht befremden, wenn man berücksichtigt, dass der Verfasser die von Beimischungen noch nicht befreite salzsaure Lösung der «Alkaloide» mit Goldchlorid fällt und das erhaltene Golddoppelsalz direct, ohne vorher umzukrystallisiren, analysirt. Dass so eine sonderbare Art der chemischen Untersuchung überhaupt keine guten Resultate geben konnte, ist selbstverständlich.

2) Fl. Stöckly, Journ. f. pr. Ch., N. F., Bd. 24, S. 17.

sagt, wie dieser Stoff im Gehirn bestimmt werden kann (l. c., S. 202). Wenn aber Thudichum den Harnstoff aus dem Gehirn wirklich isolirt hat, so wären die genaueren Beweise der Identität von der erhaltenen Substanz mit dem Harnstoff sehr wünschenswerth, da die Fälle, wo andere Körper als Harnstoff angesehen wurden, schon vorgekommen sind. Solche Beweise fehlen leider in der Thudichum'schen Abhandlung ganz und gar.

Den Arbeiten der früher erwähnten Verfasser gegenüber hat Brieger¹⁾ aus dem Gehirn zwei bestimmte Leukomatine isolirt. Nach dem Kochen von grossen Mengen der menschlichen Gehirne mit Barytwasser erhielt Brieger Chloroplatinate, die in Wasser zum Theil schwer löslich waren; der leicht lösliche Theil erwies sich als Cholinplatinchlorid; die schwer lösliche Portion bestand grösstentheils aus Ammoniumplatinchlorid, dem ein amorpher Körper beigemischt war; einmal aber wurde bei der Analyse von diesem schwer löslichen Chloroplatinat 33,91% Pt gefunden, und das Platinchloriddoppelsalz von einer anderen Darstellung gab 33,63 resp. 33,86% Pt und 5,42% N, während der Formel von Neurinplatinchlorid ein Gehalt von 33,60% Pt und 4,83% N entspricht. Daraus zieht Brieger die Folgerung, dass die analysirte Verbindung Neurinplatinchlorid war. Es scheint dem Verfasser nur das auffallend zu sein, dass das Neurin im Gehirn in einer sehr geringen Menge vorhanden ist, häufig sogar ganz fehlt; die Ursache soll die starke Zerlegung sein, welche die organischen Basen beim Kochen mit Barytwasser erleiden, und welche durch eine reichliche Bildung von Ammoniak manifestirt wird. Um die zerlegende Wirkung von kochendem Barytwasser zu vermeiden, digerirte Brieger menschliche Gehirne mit 2% Salzsäure auf dem Wasserbade während 2 Stunden und erhielt dabei ein in langen Nadeln krystallisirendes Salz, welches in absolutem Alkohol unlöslich, in Wasser dagegen sehr löslich war. Das aus diesem Chlorid dargestellte Platinchloriddoppelsalz enthielt 38,52% Pt, während für die Formel von Neuridin-

1) L. Brieger, Ueber Ptomaine, Berlin. 1885, S. 59—62.

platinchlorid 38,49% Pt berechnet sind. Der in schwacher Salzsäure nicht gelöste Theil von Gehirnen wurde mit starker Salzsäure auf dem Wasserbade während 2 Stunden erwärmt; aus der saueren Lösung wurde Cholin erhalten. Neurin konnte bei dieser Behandlung gar nicht gefunden werden.

Somit ist die interessante und wichtige Frage nach dem Vorkommen von specifischen Leukomatinen im Gehirne durch die Untersuchungen von Brieger in ein neues Stadium gebracht, da in der eben erwähnten Arbeit schon keine Rede ist von den «ptomatinähnlichen» resp. «alkaloidartigen» Körpern, sowie von den Substanzen, deren grösster Theil lediglich aus unbekannten Beimischungen besteht, sondern der Verfasser zwei gut charakterisirte Verbindungen aus dem Gehirn isolirt haben will. Dass das zweite von Brieger beschriebene Leukomatin mit dem Neuridin identisch ist, kann man als bewiesen betrachten, da der Autor ausser der ganz gut stimmenden Platinbestimmung auch die für Neuridinchlorid charakteristische Unlöslichkeit in absolutem Alkohol bei dem salzsauren Salze der betreffenden Base constatirt hat, aber die Identität des anderen Leukomatins mit dem Neurin bleibt noch fraglich, solange die Angabe über das Vorkommen desselben im Gehirn nur auf der Platin- und Stickstoffbestimmung basirt und keine für Neurin charakteristischen Eigenschaften¹⁾ erwähnt sind. Es ist nicht zu verneinen, dass die Analysen zur Formel von Neurinplatinchlorid gut passen, doch entscheiden solche Analysen selbstverständlich die Frage nicht, ob es der Verfasser mit einem Monamin resp. mit einer Ammoniumbase vom Molekulargewicht des Neurins oder mit einem Diamin von dem doppelten Molekulargewichte zu thun hatte, und ob die analysirte Verbindung Neurin oder irgend eines von den verschiedenen theoretisch denkbaren Isomeren desselben war.

1) Die Zerfliesslichkeit des Chlorids, welches in Wasser und in absolutem Alkohol leicht löslich ist; die schwere Löslichkeit des Goldchloriddoppelsalzes und des Pikrates in Wasser; die krystallographischen Eigenschaften des Platinchloriddoppelsalzes, welches in Wasser ziemlich löslich ist; vor Allem aber die Bildung von dem charakteristischen Geruch nach Trimethylamin beim Erhitzen der Verbindungen von Neurin.

Ich muss aber sogleich hinzufügen, dass ich daran, dass Brieger aus einigen Gehirnen Neurin wirklich isolirt habe, viel weniger zweifle, als daran, dass das Neurin als ein Bestandtheil des normalen Gehirns aufzufassen sei. Es ist nochmals zu erinnern, dass Brieger es selbst als auffallend bezeichnet, dass das Neurin beim Kochen von Gehirnen mit Barytwasser nur in zwei Fällen und in einer sehr geringen Menge erhalten, beim Digeriren von Gehirnen mit Salzsäure aber ganz vermisst wurde. Man könnte denken, dass Neurin sich beim Kochen von Cholin mit Barytwasser bildet, doch ist diese Vermuthung, wie ich es gezeigt habe,¹⁾ unrichtig, und ausserdem gibt diese Annahme ebensowenig wie andere Vorstellungen, die man sich über die Bildung von Neurin machen kann, eine Erklärung davon, wesshalb dieser Körper im Gehirn nur in einzelnen Fällen gefunden worden ist. Nach Brieger's Meinung kann das seltene Vorkommen, sowie der geringe Gehalt des Gehirns an Neurin davon abhängig sein, dass Neurin beim Kochen mit Barytwasser eine Zersetzung erleidet. Dass dies nicht der Fall ist,²⁾ habe ich nachgewiesen, und es ist noch zu berücksichtigen, dass Brieger kein Neurin beim Digeriren des Gehirns mit Salzsäure gefunden hat, obgleich diese Base durch die Einwirkung von verdünnter Salzsäure ebensowenig verändert wird,³⁾ wie beim Kochen mit Barytwasser.

Vielleicht kann das unbeständige Vorkommen von Neurin im Gehirn seine Erklärung finden, wenn man die Frage aufwirft, in wie fern die Gehirne, mit denen Brieger arbeitete, frisch waren. Für seine Untersuchungen benutzte der Verfasser menschliche Gehirne. Man darf wohl annehmen, dass zwischen dem Tode und dem Beginn der chemischen Untersuchung eine mehr oder weniger lange Zeitdauer verflossen war, wie auch aus folgenden Worten von Brieger (l. c., S. 61) zu schliessen ist: «Die zerquetschte Gehirnmasse von menschlichen Individuen, die noch nicht allzu lange mit dem Tode abgegangen

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 537.

2) Ibid., Bd. XXVI, S. 187.

waren»; also kamen die Gehirne zur Untersuchung jedenfalls nicht unmittelbar nach dem Tode von den Individuen. Zwar erwähnt Brieger die Abwesenheit von Fäulniss in den von ihm untersuchten Gehirnen, doch können zweifellos in einem so complicirt zusammengesetzten und so leicht zersetzlichen Organe, wie ein Gehirn, schon lange vor der offenbaren Fäulniss, die durch gewöhnliche Kennzeichen zu constatiren wäre, chemische Processe Statt haben, die zur Bildung von neuen, im Gehirn ursprünglich abwesenden Stoffen führen. Zur Bekräftigung des Gesagten will ich die Arbeit von Stöckly¹⁾ erwähnen, welche zeigt, wie schnell nach dem Tode sich die Zusammensetzung des Gehirns ändert: der Verfasser hat gefunden, dass im ganz frischen Ochsengehirn Bernsteinsäure und Hydrozimmersäure fehlen, und nur eine minimale Menge von flüchtigen Fettsäuren vorhanden ist, dass aber schon nach 6 Stunden²⁾ die Bernsteinsäure erscheint; ebenso ist schon in den ersten Stunden der Fäulniss die Entwicklung von Amidosäuren und von flüchtigen Fettsäuren zu constatiren; nach 24 Stunden enthält das Gehirn die Hydrozimmersäure, und nach 48 Stunden ist die Bernsteinsäure schon wiederum verschwunden. Da aber durch die Untersuchungen von Brieger³⁾ festgestellt ist, dass das Neurin (und das Neuridin) schon im Anfange der Fäulniss erscheint, so liegt die Vermuthung nahe, dass in den Fällen, wo in den Gehirnen eine geringe Menge von Neurin gefunden war, die untersuchten Organe durch die beginnende Fäulniss zufällig etwas mehr in ihrer Zusammensetzung verändert waren als die für die übrigen Versuche angewandten Gehirne. Was das von Brieger im menschlichen Gehirne gefundene Neuridin betrifft, so ist in der Abhandlung von Brieger nicht mitgetheilt, ob dieser Körper

1) Fl. Stöckly, Journ. f. pract. Chem., N. F., Bd. 24, S. 17.

2) Es ist zu bemerken, dass die Versuche von Stöckly bei 35 bis 40° C. ausgeführt waren, doch kann vermuthlich auch die Temperatur im Innern des Gehirns beim ungeöffneten Schädel einige Stunden lang etwa 30° C. betragen, wenn man sogar eine mögliche postmortale Temperaturerhöhung als Folge der nach dem Tode vor sich gehenden chemischen Processe nicht berücksichtigt.

3) L. Brieger, Ueber Ptomaine. Berlin. 1885. S. 19. — Weitere Untersuchungen über Ptomaine. Berlin. 1885. S. 34.

einen constanten oder zufälligen Bestandtheil des Gehirns bildet, so dass in der Hinsicht keine Discussion möglich ist, aber gerade das unconstante Vorkommen des Neurins macht die Betrachtung dieses Körpers als eines normalen Bestandtheils des Gehirns noch sehr zweifelhaft.

Es ist noch eine Vermuthung möglich, nämlich die, dass die Bildung von Neurin in den Fällen, wo dieser Körper im Gehirn gefunden war, in Zusammenhang mit irgend einer pathologischen Veränderung im Laufe der chemischen Processe des Gehirns zu stellen sei. Ist diese Vermuthung richtig, so erlangt das Vorkommen von Neurin im Gehirn eine neue wichtige Bedeutung, da man das Erscheinen von Neurin im Gehirn mit pathologischen Processen dieses Organes und mit gewissen allgemeinen Krankheitssymptomen zusammenstellen und die Betrachtung der Geschichte von der Entstehung des Neurins im Gehirne einen Beitrag zur Kenntniss der Pathologie von chemischen Processen des Gehirns liefern könnte.

Die Frage nach dem Vorkommen von Neurin und von anderen Leukomatinen im Gehirn hat zweifellos eine grosse Wichtigkeit. Sie kann eine Aufklärung bringen über die noch immer dunklen chemischen Processe, die im Gehirne vor sich gehen, der Nachweis des Vorkommens von toxisch wirkenden Leukomatinen im Gehirn kann aber auch wichtig werden für die Lehre von der Autointoxication des Gehirns oder sogar des ganzen Organismus bei krankhaften Vorgängen im Gehirn. Die Untersuchung der Produkte der sogenannten unvollständigen Oxydation¹⁾ der Gehirnbestandtheile dürfte in Anbetracht der eigenartigen und von den übrigen Organen abweichenden Zusammensetzung des Gehirns von einem besonderen Interesse sein. Es ist kaum zu bezweifeln, dass auch die im Gehirne stattfindenden chemischen Processe sich in manchen Punkten von den in den übrigen Theilen des Organismus vorgehenden chemischen Processen nicht unwesentlich unterscheiden, und somit muss die möglichst sorgfältige und ausführliche Untersuchung der Zwischenprodukte vom Abbau der Bestandtheile

¹⁾ Ein Theil von solchen Stoffen ist jetzt wohl als Produkte von Hydratation zu betrachten.

des Gehirns ein Licht auf das Wesen der specifischen chemischen Processe des Gehirns werfen.

Die weiter unten angeführte chemische Untersuchung des Gehirns macht keinen Anspruch auf die Lösung einer so umfangreichen Aufgabe, da ich, als ich meine Arbeit begonnen habe, nur untersuchen wollte, ob im frischen normalen Gehirn Neurin enthalten ist; beiläufig sind mir einige andere Leukomatine des Gehirns begegnet. Die Frage über das Vorkommen von Neurin im Gehirn schien mir von einem besonderen Interesse zu sein,¹⁾ da man gegenwärtig gewisse psychische Krankheitserscheinungen in Zusammenhang zu bringen versucht mit der Intoxication des Gehirns durch toxische Leukomatine, speciell durch das Neurin, als den einzigen stark giftigen Körper, welcher darin enthalten sein soll.

Da ich die Absicht hatte, eine Reihe von vergleichend chemischen Untersuchungen des Gehirns zu unternehmen, so habe ich für meine erste Arbeit die Gehirne von Thieren, namentlich von Ochsen, genommen, um sicher zu sein, dass mein Ausgangsmaterial vollkommen frisch war. Die Gehirne von den eben geschlachteten Thieren wurden der Verarbeitung noch warm unterworfen.

Da nach Brieger's Angaben²⁾ das Lecithin des Gehirns resp. die Substanz oder das Gemenge von Substanzen, welche Brieger für das Lecithin des Gehirns hält, der älteren Meinung entgegen kein Cholin bei der Einwirkung selbst von 2%iger Salzsäure abspalten soll, und da andererseits im Neurin keine alkoholische Hydroxylgruppe ist, die demselben eine Fähigkeit zur Esterbildung mit den Säuren ertheilen könnte, so hatte ich Gründe vorauszusetzen, dass das Neurin, wenn es im Gehirn überhaupt vorhanden ist, dort irgend ein Salz bilden würde, während das Cholin des Gehirns, wenigstens zum grössten Theil, in esterartigen Verbindungen enthalten sein sollte. In Folge dessen hoffte ich, dass eine vorläufige annähernde

1) Vergl. diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 513.

2) L. Brieger, Ueber Ptomaine. Berlin. 1885, S. 61.

Trennung von Neurin und Cholin schon durch Extrahiren des Gehirns durch mit Salzsäure sehr schwach angesäuertes Wasser erzielt werden kann. Für die Trennung des Neurins und des Cholins von den übrigen Leukomatinen, die in das mit angesäuertem Wasser dargestellte Extract des Gehirns übergehen konnten, benutzte ich die bekannte Methode von Brieger,¹⁾ als die einzige, die gegenwärtig Ptomaine und ihnen ähnliche Substanzen von einander sicher unterscheiden lässt.

Wie aus den von mir ausgeführten Untersuchungen²⁾ der verschiedenen Verbindungen von Cholin und Neurin ersichtlich ist, konnte ich zur Trennung des Neurins von dem Cholin nur die Platinchloriddoppelsalze dieser Verbindungen verwenden, welche eine fractionirte Krystallisation mit einer mechanischen Auslese vereinigen lassen. Da ich die unterscheidenden Merkmale von Neurin- und Cholinplatinchloriden schon früher (a. a. O.) beschrieben habe, so will ich hier nicht darauf zurückkommen. So gross auch die Unterschiede in der Löslichkeit und in den krystallographischen Eigenschaften von den erwähnten Salzen sein mögen, so hielt ich doch einen Vorversuch, der die Möglichkeit der Trennung eines Gemenges von Cholin und Neurin in Gestalt ihrer Platinchloridverbindungen beweist, nicht für überflüssig. Zu dem Zwecke habe ich 1,5 gr. reines Cholinplatinchlorid und 1,0 gr. reines Neurinplatinchlorid in einer kleinen Menge von heissem Wasser gelöst; nach dem Erkalten schieden sich kleine Octaeder aus, die abfiltrirt, mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen und abgepresst wurden:

I. 0,1147 der bei 110° getrockneten Substanz gaben beim Glühen 0,0678 = 32,96% Pt.

Der Rest der Krystalle wurde in der Mutterlauge beim Erwärmen gelöst; die nach Erkalten ausgeschiedenen kleinen Octaeder wurden der ersten Fraction ähnlich behandelt:

II. 0,1227 der bei 115° getrockneten Substanz lieferten beim Glühen 0,0406 = 33,09% Pt.

¹⁾ L. Brieger, Unters. über Ptomaine, III. Theil. Berlin. 1886, S. 19—23.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 517 u. ff.; Bd. XXVI, S. 176 u. ff.

Die Mutterlauge wurde über Schwefelsäure langsam verdunstet, aus dem erhaltenen Krystallgemenge die grösseren Krystalle des Cholinplatinchlorids ausgelesen, der Rest aus heissem Wasser umkrystallisirt. Die Mutterlauge der nach Erkalten ausgeschiedenen zweiten Fraction von kleinen Octaedern gab beim langsamen Verdunsten wiederum ein Gemenge von zwei Krystallarten, aus dem noch eine gewisse Menge von Krystallen des Cholinplatinchlorids ausgesucht werden konnte. Die beiden Portionen (0,7 gr.) von Octaedern wurden aus heissem Wasser zusammen umkrystallisirt und die nach dem Erkalten wiederum ausgeschiedenen Octaeder mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen und analysirt:

III. 0,1503 der bei 115° getrockneten Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0502 = 33,40% Pt.

Die beiden Portionen (1,3 gr.) von den mechanisch ausgelesenen prismatischen und tafelförmigen Krystallen von Cholinplatinchlorid wurden zusammen aus wenig heissem Wasser umkrystallisirt, wobei sich eine kleine Menge von Krystallen ausschied, die wie tafelförmige Krystalle des Neurinplatinchlorids aussahen:

IV. 0,0931 der bei 115° getrockneten Substanz lieferten beim Glühen 0,0304 = 32,65% Pt.

Die Mutterlauge von diesen Krystallen schied beim langsamen Verdunsten Krystalle von Cholinplatinchlorid aus, die aus wenig heissem Wasser umkrystallisirt wurden: die nach Erkalten erhaltenen nadelförmigen Krystalle wurden analysirt:

V. 0,1554 der bei 115° getrockneten Substanz gaben beim Glühen 0,0500 = 32,18% Pt.

Die neue Mutterlauge lieferte beim langsamen Verdunsten grosse Prismen von Cholinplatinchlorid, die mit wenig kaltem Wasser gewaschen und analysirt wurden:

VI. 0,0979 der bei 115° getrockneten Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0312 = 31,87% Pt.

	Gefunden:					
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Pt	32,96%	33,09%	33,40%	32,65%	32,18%	31,87%
	Berechnet für:					
	$(C_5H_{14}NCl)_2 + PtCl_4$		$(C_5H_{14}NOCl)_2 + PtCl_4$			
	33,60%		31,64%			

Dieser Versuch zeigt somit, dass die fractionirte Krystallisation aus heissem Wasser im Verein mit mechanischer Trennung und mit dem Auswaschen durch kaltes Wasser in einem Gemenge von Cholin- und Neurinplatinchloriden die Gegenwart von Neurin sicher nachweisen lässt (Anal. III); das einmalige Umkrystallisiren des Gemenges ist zu diesem Zwecke nicht hinreichend (Anal. I u. II)¹⁾. Mit keinen grossen Schwierigkeiten ist auch die Isolirung von Cholinplatinchlorid aus dem Gemenge verknüpft (Anal. VI).

Bei einem zweiten Versuche, wo die Menge des Neurinplatinchlorids (0,22 gr.) sowohl absolut wie auch im Verhältniss zur Quantität von Cholinplatinchlorid (0,42 gr.) vermindert wurde, konnte ich nach dem oben beschriebenen Verfahren je 0,1 gr. von den zweimal umkrystallisirten reinen Neurin- und Cholinplatinchlorid zurückbekommen :

VII. 0,1001 der bei 115° getrockneten Substanz lieferten beim Glühen 0,0333 = 33,27% Pt.

VIII. 0,0951 der bei 115° getrockneten Substanz gaben beim Glühen 0,0300 = 31,55% Pt.

Nach dieser kleinen Abschweifung kehre ich zur Beschreibung der Untersuchung zurück.

7 Ochsengehirne wurden von den Häuten abpräparirt und mit Glas möglichst zerquetscht; der erhaltene Brei mit 6 Liter destillirtem, mit Salzsäure schwach angesäuertem Wasser nicht

1) Ich möchte darauf aufmerksam machen, dass beim Umkrystallisiren von Gemengen des Neurin- und Cholinplatinchlorids sehr häufig Krystalle erhalten werden, die ganz wie die des Neurinplatinchlorids aussehen, keine Beimischung von Cholinplatinchlorid erkennen lassen und einen Platingehalt haben, der 32,62%, d. h. dem Platingehalt der in molekularen Verhältnissen gemischten Cholin- und Neurinplatinchloride sehr nahe steht; als Beispiel kann ich die Anal. I u. IV, sowie die Analyse der Zwischenfraction der für die Bestimmungen VII und VIII benutzten Krystalle, welche 32,48% Pt enthielt, anführen. Da die Löslichkeit von Cholin- und Neurinplatinchlorid bekanntlich sehr verschieden ist und die Krystalle vor der Analyse mit kaltem Wasser ausgewaschen wurden, so ist vielleicht die Vermuthung gerechtfertigt, dass es sich in solchen Fällen nicht um eine blosse Mischung, sondern um eine lockere Molekularverbindung handelt, die durch wiederholtes Umkrystallisiren auseinandergeht.

höher als bei 70° $\frac{1}{4}$ Stunde lang erwärmt,¹⁾ dann filtrirt, der Gehirnrückstand nach abermaligem Zerdrücken mit Glas derselben Behandlung noch zweimal unterworfen und dann zur Darstellung des alkoholischen Extractes verbraucht. Merkwürdigerweise begegnete ich keinen besonderen Schwierigkeiten bei der Bereitung der wässerigen Extracte von Gehirnbrei, welcher bekanntlich mit Wasser stark aufquillt und dabei eine trübe, fast unfiltrirbare, einer Emulsion ähnliche Flüssigkeit liefert. Dies war aber nicht der Fall: der erste und der dritte Auszug des Gehirns waren klar und leicht filtrirbar, und nur der zweite trübe Aufguss filtrirte schlecht und wurde zuerst colirt. Wodurch dieses günstige Verhältniss bedingt wurde, ob hier der möglicher Weise richtig getroffene Salzsäurezusatz oder das vorsichtige Erwärmen diese Wirkung hervorgebracht haben, kann ich nicht sagen.

Die vereinigten wässerigen Auszüge wurden bis zur Syrupdicke eingedampft und dann nach und nach mit einem Ueberschuss von 95°igem Alkohol gemischt, der entstandene klebrige Niederschlag in wenig Wasser gelöst, mit Alkohol wiederum gefällt und diese Manipulation nochmals wiederholt. Die alkoholischen, etwas eingeeengten Flüssigkeiten wurden mit heisser

¹⁾ Während meiner ganzen Arbeit legte ich besonderes Gewicht darauf, dass die Möglichkeit der Bildung von künstlichen Produkten als eine Folge einer ungenügenden Vorsicht bei chemischen Manipulationen beseitigt wäre. Um später Wiederholungen zu vermeiden, halte ich es für zweckmässig, einige technische Details, die für die gesammte Untersuchung geltend sind, schon an dieser Stelle anzudeuten.

Alle Lösungen von freien Leukomatinen resp. von Chloriden derselben wurden nicht höher als bei 70°, mit zunehmender Concentration aber nicht höher als bei 60° resp. im Vacuum verdampft. Den Angaben von Brieger gemäss, dass die Ptomatine, denen die Leukomatine nach ihren Eigenschaften so nahe stehen, gegen die Einwirkung von Säuren viel beständiger sind als gegen die von Alkalien, manipulirte ich, von der Darstellung des wässerigen Extractes des Gehirns her, ausschliesslich mit Flüssigkeiten, deren Reaction mittelst verdünnter Salzsäure fortwährend sehr schwach sauer erhalten wurde; um andererseits die zersetzende Wirkung der Salzsäure zu vermeiden, wurde der Ueberschuss derselben, der beim Verdampfen der Lösungen resp. bei der Zerlegung von Doppelsalzen entstehen konnte, mittelst Soda abgestumpft.

gesättigter alkoholischer Lösung von Bleizucker unter möglichster Vermeidung eines Ueberschusses des Reagens gefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und bis zu einem dicken Syrup eingedampft, welcher mit 95^oigem Alkohol wiederholt extrahirt wurde. Die alkoholische Lösung wurde mit einem Ueberschuss von einer concentrirten alkoholischen Sublimatlösung versetzt und das Gemenge 4 Monate lang stehen lassen. Der entstandene, theils weisse und pulverige, theils gelbliche und harzige Niederschlag wurde abfiltrirt und mit Alkohol ausgewaschen. Das Filtrat, welches einen bedeutenden Ueberschuss von Quecksilber enthielt, gab dessenungeachtet nach Zusatz von der alkoholischen Lösung dieses Reagens einen neuen Niederschlag, welcher nach 3 Monaten abfiltrirt, mit Alkohol ausgewaschen und von dem ersten Niederschlage gesondert untersucht wurde, da möglicher Weise eine Trennung von Leukomatinen zum Theil schon durch die fractionirte Fällung mit Quecksilberchlorid erzielt war. Das neue Filtrat schied nach dem starken Eindampfen einen nur äusserst geringen amorphen Niederschlag aus (vgl. S. 75). Die filtrirte Flüssigkeit wurde mit Wasser verdünnt, mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtrirt und fast zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt, wobei nur Mineralsalze ungelöst zurückblieben, von der alkoholischen Lösung der Alkohol verjagt, der syrupartige Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung mit Salpetersäure angesäuert und mit Phosphormolybdänsäure gefällt.

Von dem ersten Quecksilberchloridniederschlage blieben bei der sorgfältigen Extraction desselben mit dem mit Salzsäure schwach angesäuerten Wasser etwa 60^o/_o ungelöst.¹⁾

¹⁾ Der in heissem Wasser unlösliche Theil lieferte nach Entfernung des Quecksilbers ein Gemenge von amorphen Verbindungen, die sich in absolutem Alkohol theilweise lösten, keinen Niederschlag mit Salpetersäure, mit Ferrocyankalium in Gegenwart von Essigsäure, mit Platinchlorid und keine Biuretreaction gaben; Tannin und Phosphormolybdänsäure erzeugten reichliche Niederschläge; beim Hinzufügen von Millon'schem Reagens wurde eine voluminöse amorphe weisse Fällung erhalten, die sich beim Erwärmen ohne rothe Färbung löste und nach

Beim Verdampfen der Lösung schieden sich zuerst nur amorphe Niederschläge aus, die sich bei der erneuerten Behandlung mit heissem Wasser nicht lösten; aus der stark eingeeengten Flüssigkeit wurde nur 0,9 gr. undeutlich krystallinisches Pulver erhalten, welches noch viel von den amorphen Verbindungen enthielt.¹⁾ Somit konnte in der wässerigen Flüssigkeit überhaupt nur eine geringe Menge von Cholin vorhanden sein, da sonst seine schwer lösliche Quecksilberchloridverbindung hätte auskrystallisiren müssen.

Das Filtrat von diesen amorphen Niederschlägen wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das neue Filtrat auf 50 ccm. eingedampft (vergl. die Anmerkung auf S. 64) und mit gepulverter Pikrinsäure versetzt, die Mischung bis zur Lösung der Pikrinsäure erwärmt. Der nach dem Erkalten abgeschiedene körnige Niederschlag (a) wurde abfiltrirt und mit der gesättigten wässerigen Lösung der Pikrinsäure ausgewaschen; aus dem eingedampften Filtrate wurde noch eine geringe Menge desselben Niederschlages erhalten, die mit der ersten Portion vereinigt wurde.

Das erhaltene Pikrat (a), welches sogar in heissem Wasser sehr schwer löslich war, wurde in dem mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuertem Wasser suspendirt und die Pikrinsäure daraus mit Aether wiederholt ausgezogen, die wässerige Lösung zum Trocknen verdampft, der Rückstand mit 95%igem Alkohol extrahirt. Die alkoholische Lösung gab mit alkoholischer Lösung von Platinchlorid nur einen ganz unbedeutenden Niederschlag, welcher sogar in heissem Wasser so gut wie gar nicht löslich war. Keine Spuren von Neuridinplatinchlorid konnten daraus isolirt werden.

dem Erkalten wiederum ausschied. Nach Brieger (Weitere Unters. üb. Ptom., Berlin. 1885, S. 54) sollen in diesen, in Wasser unlöslichen, aus faulenden Substanzen erhaltenen Quecksilberchloridverbindungen Peptone und Albuminate enthalten sein; Stadthagen (Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 15, S. 398) hält analoge aus dem Harn isolirte Verbindungen für eiweissähnliche Stoffe.

¹⁾ Das daraus dargestellte Platindoppelsalz wog nur 0,05 gr. und war grösstentheils amorph und in Wasser unlöslich.

Das alkoholische Filtrat von diesem Niederschlage wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die filtrirte Flüssigkeit zur Trockne eingedampft, der Rückstand zur Trennung von Mineralsalzen wiederholt mit kleinen Mengen von 95%igem Alkohol extrahirt und die alkoholische Lösung abermals verdunstet. Der erhaltene Syrup erstarrte nach Erkalten zu einer strahligen, an der Luft nicht zerfliesslichen Masse. Ein krystallinischer gelber Niederschlag, welcher nach Zufügen dazu von Goldchloridlösung entstanden war, wurde abfiltrirt, dreimal mit kaltem Wasser ausgewaschen und abgepresst.¹⁾ Schliesslich wurden nur 0,18 gr. einer im kalten Wasser schwer löslichen Verbindung erhalten, die aus heissem mit Salzsäure schwach angesäuertem Wasser umkrystallisirt wurde.²⁾ Die nach Erkalten ausgeschiedenen, goldgelben, gar kein reducirtes Gold enthaltenden, kleinen Prismen wurden analysirt:

IX. 0,1591 der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,0769 Au als Au_2S_3 abgeschieden: aus dem mit CaCO_3 eingedampften Filtrate davon wurden 0,2188 AgCl erhalten.

Gefunden:

IX.

Au 48,33%

Cl 34,02%

Leider reichte die geringe Menge der Substanz sogar zur Stickstoffbestimmung nicht aus. Das aus diesem Filtrate dargestellte Chlorid gab mit einer gesättigten Lösung der Pikrinsäure einen hellgelben krystallinischen Niederschlag, der bei 197—199° ohne bemerkbare Zersetzung schmolz. Beim Kochen des Chlorids mit Kalilauge entwichen schwach alkalische Dämpfe, die keinen bestimmten Geruch erkennen liessen.

Das Filtrat von dem Anfangs erhaltenen, schwer löslichen

1) Um Wiederholungen zu vermeiden, will ich andeuten, dass alle den Analysen unterworfenen Niederschläge vorher mit kaltem Wasser ausgewaschen und dann zwischen Filtrirpapier vorsichtig abgepresst wurden.

2) Die Goldchloriddoppelsalze wurden aus heissen Lösungen stets unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Salzsäure umkrystallisirt, deren Gegenwart nothwendig ist, um diese Salze vor Zersetzung zu schützen.

Pikrat (a) (S. 66) wurde durch Ansäuern mit Salzsäure und wiederholtes Schütteln mit Aether von Pikrinsäure befreit, dann zum Trocknen eingedampft, der Rückstand sorgfältig mit kaltem absoluten Alkohol ausgezogen, die alkoholische Lösung verdampft und der neue Rückstand mit absolutem Alkohol nochmals extrahirt. Auf diese Weise wurden die Chloride in eine in absolutem Alkohol lösliche (b) und in eine darin unlösliche resp. schwer lösliche (c) Portion getheilt.

Die Portion b war für mich besonders wichtig, da, wenn Neurin im Ochsenhirn vorhanden war, es am wahrscheinlichsten gerade hier zu finden war, obschon die Abwesenheit desselben im Niederschlag a beweist, dass im Gehirn überhaupt eine nur sehr geringe Menge von Neurin vorhanden sein konnte. Die absolut alkoholische Lösung von b wurde mit alkoholischer Lösung von Platinchlorid gefällt, der schmutzig gelbe, flockige Niederschlag abfiltrirt und mit Alkohol ausgewaschen.¹⁾ Dieser Niederschlag bestand aus drei Theilen: der eine bildete ein gelbes Pulver, welches in kaltem Wasser sehr schwer, in heissem Wasser schwer löslich war; der zweite Theil krystallisirte aus Wasser in orangerothen langen Prismen oder in sechsseitigen Tafeln, dem Cholinplatinchlorid ganz ähnlich; der dritte Theil bestand aus einer amorphen gelblich-braunen Substanz, die in kaltem Wasser sehr schwer, in heissem Wasser etwas mehr löslich war. Die Trennung der leicht löslichen orangerothen Krystalle von dem schwer löslichen gelben krystallinischen Pulver veranlasste keine Schwierigkeiten und wurde durch dreimal wiederholte Behandlung mit wenig kaltem Wasser, Verdunsten der Lösung, Ausziehen des Rückstandes mit kaltem Wasser u. s. w. ausgeführt. Desto umständlicher war die Befreiung des leicht löslichen Platindoppelsalzes von der beigemischten amorphen Substanz,²⁾ welche des grossen Löslichkeitsunterschiedes un-

1) Im Filtrate konnte nur eine äusserst geringe Menge einer Substanz gefunden werden, welche dieselben Eigenschaften hatte, wie die aus dem schwer löslichen Pikrate a isolirte Substanz.

2) Die chemische Natur von solchen amorphen Platinverbindungen ist unbekannt. Fast alle Verfasser, die Cholinplatinchlorid aus den ver-

geachtet dem leicht löslichen Salze hartnäckig anhaftete und sich weder durch Erkalten der heissen Lösungen, noch durch Ausziehen mit kaltem Wasser vollständig entfernen liess. Die Trennung gelang aber leicht, als ich das leicht lösliche Platin-doppelsalz mit Schwefelwasserstoff zersetzte und das erhaltene, krystallinische, an der Luft rasch zerfliessliche Chlorid in die Goldchloridverbindung überführte, welche in kaltem Wasser schwer löslich war. Diese Verbindung wurde aus heissem Wasser umkrystallisirt und die dabei erhaltenen, nadelförmigen, reingelben, von einer Beimischung einer amorphen Substanz ganz freien Krystalle analysirt:

X. 0,0710 der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,0316 Au, welches als Au_2S_3 abgeschieden war; aus dem mit $CaCO_3$ eingedampften Filtrate davon wurden 0,0915 $AgCl$ erhalten.

Gefunden:		Berechnet für
X.		$C_6H_{14}NOCl + AuCl_3$
Au	44,50 %	44,49 %
Cl	31,88 %	32,01 %

Somit war die aus Portion b isolirte Substanz nach den Eigenschaften des Chlorids, des Platin- und des Goldchloriddoppelsalzes, sowie nach den Resultaten der Analyse sicher Cholin. Ebenso wenig kann man bezweifeln, dass das Neurin in dieser Portion vollständig abwesend war, da kein Salz mit den Eigenschaften von Neurinplatinchlorid beim Umkrystallisiren der Platinchloriddoppelsalze erhalten werden

schiedensten Theilen des Thierorganismus darstellten, erwähnen der amorphen Substanzen, die dem Cholinplatinchlorid beigemischt waren. Brieger (Unters. üb. Plom. III. Th., Berlin. 1886, S. 23) hält eine von derartigen amorphen Platinverbindungen für die eines Eiweissstoffes und hat darin ca. 29% Pt gefunden. In einem Falle habe ich bei der Analyse von einer amorphen, N und Cl enthaltenden Platinverbindung ca. 47% Pt bekommen, sodass jedenfalls reducirtes Platin dieser Substanz beigemischt sein musste.

Selbstverständlich können die amorphen Platinverbindungen unter Umständen den Platingehalt von Platindoppelsalzen der Leukomatine verändern, d. h. sowohl erhöhen, wie auch herabsetzen. Am besten lassen sie sich durch die Ueberführung der Platin- in Golddoppelsalze entfernen.

konnte und die Gegenwart von Neuringgoldchlorid, welches in kaltem Wasser fünfmal schwerer als Cholingoldchlorid löslich ist, bei der Analyse leicht zu entdecken wäre, die aber die für das Cholingoldchlorid gut stimmenden Zahlen lieferte.

Die Portion c (S. 68), mit Hülfe des heissen 70°igen Alkohols von Mineralsalzen möglichst befreit, lieferte mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid einen Niederschlag,¹⁾ der aus heissem Wasser, worin er ziemlich schwer löslich war, umkrystallisirt wurde. Nach Erkalten schieden sich octaedrische Kryställchen aus, denen noch eine kleine Menge von einer amorphen Substanz beigemischt war, und die, sammt dem entsprechenden, in Wasser schwer löslichen Theile des aus der Portion b erhaltenen krystallinischen Platinchloriddoppelsalzes, aus heissem Wasser nochmals umkrystallisirt wurden. Die ausgeschiedenen kleinen gelblich-orangen Octaeder enthielten 41,02 % Pt. Zwar sind für Ammoniumplatinchlorid 43,91 % Pt berechnet, doch zeigten die Resultate der qualitativen Untersuchung des Filtrates von Platinsulfid, dass hier ohne Zweifel Ammoniumplatinchlorid vorlag, welches wahrscheinlich noch mit irgend einer anderen Substanz verunreinigt war.

Der zweite Quecksilberchloridniederschlag (S. 65) lieferte nur 0,16 gr. eines Platinchloriddoppelsalzes, welches zum grössten Theil amorph und selbst in heissem Wasser unlöslich war. In dem alkoholischen Filtrate von diesem Salze konnten nur Spuren einer mit Goldchlorid fällbaren Substanz gefunden werden.

Der Phosphormolybdänsäureniederschlag (S. 65) wurde mit dem mit Salpetersäure angesäuerten Wasser ausgewaschen, dann im Wasser suspendirt, die saure Flüssigkeit mit Soda neutralisirt und mit Bleizuckerlösung unter schwachem Erwärmen auf dem Wasserbade zersetzt.²⁾ Das Filtrat wurde

¹⁾ Im Filtrate von demselben waren nur Spuren von organischen Stoffen enthalten.

²⁾ Die vollständige Zersetzung der Niederschläge von Phosphormolybdänsäuren mittelst Bleizuckers wird durch die Veränderung der Farbe und des allgemeinen Aussehens des Niederschlages und durch die

mit Schwefelwasserstoff entbleit, die nochmals filtrirte Flüssigkeit eingedampft und der Syrup mit absolutem Alkohol ausgezogen, worin alle organischen Stoffe übergingen. Der nach Verdampfen von Alkohol übrig gebliebene Rückstand wurde in einigen Tropfen Wasser gelöst und mit Goldchlorid gefällt, der Niederschlag abfiltrirt und sammt dem aus dem eingeeengten Filtrate ausgeschiedenen Niederschlage aus heissem Wasser umkrystallisirt, wobei eine geringe Menge von einer amorphen dunkelbraunen Substanz ungelöst blieb.¹⁾ Der nach Erkalten ausgeschiedene krystallinische Niederschlag wurde analysirt, wobei 45,74% Au und 30,52% Cl resultirten, so dass das Verhältniss von Gold- zu Chlorgehalt 1:3,7 gleich war und der Substanz somit noch reducirtes Gold beigemischt war. Aus dem an der Luft rasch zerflossenen Chloride wurde wiederum das Goldchloriddoppelsalz dargestellt, welches umkrystallisirt und analysirt wurde.

XI. 0,0926 der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,0411 Au als Au_2S_3 abgeschieden; aus dem mit $CaCO_3$ eingedampften Filtrate wurden 0,1200 AgCl erhalten.

[Gefunden:		Berechnet für:
XI.		$C_5H_{14}NOCl + AuCl_3$
Au	44,38 %	44,49 %
Cl	32,05 %	32,01 %

Das Verhältniss von Gold- zu Chlorgehalt war diesmal 1:4,01 gleich und die analysirte Verbindung war somit reines Cholingoldchlorid ohne eine Beimischung von dem sehr schwer löslichen Neuringgoldchlorid.

Dass kein Neurinsalz bei den Krystallisationen verloren gegangen war, wurde durch die Untersuchung von den bei dem Umkrystallisiren des analysirten Cholingoldchlorids er-

Entfärbung der Flüssigkeit manifestirt, die sich anfänglich nach der Neutralisation des Ueberschusses von Säure smaragdgrün färbt.

¹⁾ Solche amorphe, in heissem Wasser schwer lösliche Substanzen sind offenbar den oben erwähnten amorphen Platinverbindungen (S. 68) analog. Durch Umkrystallisiren oder durch wiederholtes Verdampfen der Lösung und Auflösen des Rückstandes in heissem Wasser lassen sie sich jedenfalls viel leichter und vollkommener entfernen, als es bei den Platinchloridverbindungen der Fall ist.

haltenen Mutterlaugen bewiesen. Die verdünnten Lösungen wurden mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, die alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid versetzt, der entstandene Niederschlag mit Alkohol ausgewaschen, in Wasser gelöst und die Lösung langsam verdunstet. Durch wiederholte Behandlung mit möglichst wenig kaltem Wasser wurden schiefe Prismen von Cholinplatinchlorid von einer geringen Menge der schwer löslichen orangefarbenen kleinen Octaeder getrennt. Die zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirte Substanz enthielt 37,82% Pt.

XII. 0,1039 der bei 105° getrockneten Substanz gaben 0,0393 Pt, als PtS₂ abgeschieden.

Das Filtrat von dem Platinsulfidniederschlag liess nach Verdampfen lange, an der Luft nicht zerfliessliche Nadeln zurück, welche krystallinische Niederschläge mit Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure und mit Goldchlorid gaben; das Pikrat schwärzte sich bei 240°, schmolz aber sogar bei 267° nicht; nach Zusatz von Natronlauge entwickelte sich ein dem Cadaverin sehr ähnlicher Geruch. Somit war die analysirte Verbindung keineswegs Neurinplatinchlorid.

Das Filtrat von dem Phosphormolybdänniederschlag (S. 70) wurde neutralisirt, durch Bleizucker zersetzt, das neue Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und die filtrirte Flüssigkeit zum dicken Syrup eingedampft, welcher mit absolutem Alkohol ausgezogen wurde; das Verdampfen der Lösung und das Ausziehen des Rückstandes mit absolutem Alkohol wurde behufs der möglichst vollständigen Entfernung von Mineralsalzen noch zweimal wiederholt. Die schliesslich erhaltene alkoholische Lösung wurde mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid gefällt, der mit Alkohol ausgewaschene Niederschlag zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirt und die dabei resultirten orangegelblichen kleinen Octaeder analysirt.

XIII. 0,2290 der bei 105° getrockneten Substanz lieferten 0,0948 Pt, als PtS₂ abgeschieden.

Gefunden:		Berechnet für:	
XIII.		$2 \text{ KCl} + \text{PtCl}_4$	$2 \text{ NH}_4\text{Cl} + \text{PtCl}_4$
Pt	41,40%	40,10%	43,91%.

Dass hier in der That ein Gemenge von Kalium- und Ammoniumplatinchlorid ohne irgend eine Beimischung von organischen Stoffen vorlag, wurde durch die qualitative Analyse der vom Platinsulfid abfiltrirten Flüssigkeit bewiesen.

Das alkoholische Filtrat von dem durch Platinchlorid erzeugten Niederschlage wurde mit Wasser verdünnt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, der Alkohol verjagt, die Flüssigkeit mit Bleiessig unter Zusatz von Ammoniak gefällt, das neue Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, die Flüssigkeit filtrirt und eingedampft; der syrupartige Rückstand wurde mit absolutem Alkohol ausgezogen, die Flüssigkeit von ungelösten Mineralsalzen abfiltrirt und stark eingeeengt, wobei der erhaltene Syrup selbst nach längerem Stehen nicht krystallisirte. Er wurde mit Wasser verdünnt und mit der Lösung von Quecksilberoxydnitrat gefällt, bei welcher Operation die freiwerdende Salpetersäure durch einen fein zerriebenen Brei von Baryumcarbonat, später durch Barytwasser fast vollständig neutralisirt wurde. Der ausgewaschene Niederschlag wurde im Wasser suspendirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Baryumcarbonat zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen. Nach Verdunsten der filtrirten Lösung resultirte ein syrupartiger Rückstand, der beim Stehen in langen Nadeln krystallisirte. Die Krystalle, die abgepresst wurden und nur 0,098 gr. wogen, zeigten folgende Reactionen: 1. die wässerige Lösung derselben gab mit der Lösung von Quecksilberoxydnitrat einen voluminösen weissen Niederschlag, der sich wie in der Salpetersäure, so auch in der Natriumchloridlösung leicht auflöste; 2. nach Versetzen eines Tropfens von concentrirter alkoholischer Lösung der Substanz mit einem Tropfen von concentrirter Salpetersäure schieden sich die bekannten, unter dem Mikroskop als solche identificirten Krystalle von Harnstoffnitrat aus; 3. nach Zusatz eines Tropfens von wässriger Lösung des Furfurols und eines Tropfens von Salzsäure ($d = 1,1$) zu der Substanz wurde eine schwache grüne, nach einigen Minuten eine starke violette, später eine purpurne Färbung beobachtet; 4. die vorsichtig geschmolzenen Krystalle gaben die Biuretreaction, zwar in

Folge der beim Schmelzen gebildeten gefärbten Stoffe viel weniger deutlich, als es mit reinem geschmolzenem Harnstoff beobachtet wird.

Obgleich ich aus dem Mangel an Substanz, sowie auch wegen der noch nicht vollkommenen Reinheit derselben keine Stickstoffbestimmung auszuführen im Stande war, berechtigten doch die oben angeführten Reactionen und das Isolirungsverfahren, diese Substanz als Harnstoff anzuerkennen.

Der nach dreimaliger Extraction mit Wasser zurückgebliebene Gehirnbrei (S. 64) wurde wiederholt mit Alkohol bei einer 70° nicht überschreitenden Temperatur ausgezogen. Die durch Heisswassertrichter filtrirten Auszüge (sammt dem nach Erkalten derselben ausgeschiedenen Niederschlage) wurden nach dem Verfahren von Kossel und Obermüller¹⁾ mittelst Natriumalkoholatlösung (8 gr. Natrium, 160 gr. absoluten Alkohol) verseift.²⁾ Die Mischung wurde während 18 Stunden unter häufigem Schütteln stehen lassen, dann mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert, der grösste Theil von Alkohol verjagt, die Flüssigkeit mit viel Wasser verdünnt, erwärmt und nach dem Erkalten von der ausgeschiedenen weissen talgartigen Schicht abfiltrirt, die unter Anderem aus Cholesterin, Cerebrosiden und Fettsäuren bestand. Aus dem verdünnten Filtrate wurde Natriumsulfat möglichst auskrystallisirt, die Mutterlauge mit Soda neutralisirt, mit Salzsäure schwach angesäuert und zur Syrupdicke eingedampft. Der Rückstand wurde nach und nach mit einem Ueberschuss von 95°igem Al-

1) A. Kossel u. K. Obermüller, Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 599.
— A. Kossel u. M. Krüger, Ibid., Bd. XV, S. 321.

2) Um eine mögliche tiefgreifende Einwirkung bei der Zersetzung durch Kochen mit Barythydrat zu vermeiden, wählte ich das Kossel-Obermüller'sche Verseifungsverfahren, nachdem ich mich vorher überzeugt hatte, um wie viel diese vortreffliche Methode auch vom praktischen Standpunkte aus bequemer ist, als die üblichen Verseifungsverfahren, und nachdem ich zuvor nachgewiesen hatte (diese Zeitschr. Bd. XXIV, S. 538; Bd. XXVI, S. 187), dass weder Cholin noch Neurin, bei der Anwendung dieser Methode verändert werden.

kohol versetzt und der entstandene Niederschlag mit Alkohol sorgfältig extrahiert. Die stark gefärbten alkoholischen Auszüge wurden mit einer alkoholischen Lösung von Bleizucker gefällt und die von einem voluminösen Niederschlage abfiltrirte, viel weniger gefärbte Flüssigkeit bis zur Darstellung der Quecksilberchloridniederschläge derselben Behandlung wie die wässerigen Auszüge des Gehirns (S. 65) unterworfen. Die beiden Quecksilberchloridniederschläge (A) wurden vereinigt und das Filtrat davon bis auf etwa $\frac{1}{4}$ Volumen eingedampft, wobei nach Erkalten ein grobkrySTALLINISCHER Niederschlag (B) sich ausschied, der, wie es oben angegeben ist, bei der Untersuchung von den wässerigen Gehirnextracten nicht erhalten wurde. Das Filtrat von diesem mit Alkohol ausgewaschenen Niederschlage wurde mit Phosphormolybdänsäure in derselben Weise gefällt, wie es bei den wässerigen Auszügen des Gehirns statt hatte.

Die Quecksilberchloridniederschläge A wurden mit heissem, mit der Salzsäure schwach angesäuertem Wasser ausgezogen, wobei etwa 20% einer amorphen unlöslichen Verbindung zurückblieben. Die stark gefärbte eingedampfte Lösung schied nach dem Erkalten ein Filzwerk von kleinen Nadelchen und von Trichiten aus; aus der eingedampften Mutterlauge wurde eine geringe Menge von kurzen Prismen erhalten, die ganz wie Cholinquecksilberchlorid aussahen.¹⁾ Die beiden Portionen wurden nochmals in heissem Wasser zusammen gelöst. Die zwei aus der von einer amorphen Substanz abfiltrirten Lösung ausgeschiedenen Fractionen von Krystallen wurden durch Schwefelwasserstoff zersetzt und aus dem Filtrate in der schon mehrmals beschriebenen Weise Platinchloriddoppelsalz dargestellt, welches sich in kaltem Wasser leicht auflöste (es blieb nur eine ganz geringe Menge von einer amorphen braunen Substanz zurück). Bei einem langsamen Verdunsten über Schwefelsäure schieden sich zwei

¹⁾ Die Mutterlauge von der zweiten Krystallfraction wurde getrennt untersucht. Daraus konnte mit Hülfe von Platin- und Goldchlorid ausser amorphen Substanzen nur eine geringe Menge von Cholin isolirt werden.

sehr grosse Krystalle von Cholinplatinchlorid aus; in beiden Krystallen wurde der Platingehalt bestimmt:

XIV. 0,1421 der bei 110° getrockneten Substanz gaben beim Glühen 0,0452 Pt.

XV. 0,1679 der bei 115° getrockneten Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0530 Pt.

Gefunden:			Berechnet für:
	XIV.	XV.	$(C_5H_{14}NOCl)_2 + PtCl_4$
Pt	31,81%	31,57%	31,64%.

Aus der Mutterlauge der analysirten Krystalle wurden noch zwei gut ausgebildete Krystalle von Cholinplatinchlorid und eine äusserst geringe Menge von kleinen Octaedern (s. unten) erhalten.

Das alkoholische Filtrat von der Platinchloridfällung wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die filtrirte Flüssigkeit zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung gab mit der alkoholischen Lösung von Platinchlorid einen geringen (0,12 gr.) Niederschlag, dessen wässrige Lösung schiefe Prismen von Cholinplatinchlorid mit Beimischung von einer sehr geringen Menge von kleinen Octaedern (s. unten) ausschied.

Der Quecksilberchloridniederschlag B wurde wie der Niederschlag A behandelt, mit dem einzigen Unterschiede, dass er vor der Zerlegung mit Schwefelwasserstoff nicht umkrystallisirt wurde. Das Platindoppelsalz krystallisirte in dicken Prismen von dem für die Krystalle von Cholinplatinchlorid so charakteristischen Aussehen. In diesen Prismen wurde der Platingehalt bestimmt:

XVI. 0,2399 der bei 115° getrockneten Substanz gaben beim Glühen 0,0760 Pt.

XVII. 0,1123 der bei 115° getrockneten Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0357 Pt.

Aus der Mutterlauge wurden verschiedenartige Krystalle von Cholinplatinchlorid ohne irgend eine Beimischung erhalten:

XVIII. 0,1559 der bei 110° getrockneten Substanz lieferten beim Glühen 0,0493 Pt.

	Gefunden:			Berechnet für:
	XVI.	XVII.	XVIII.	$(C_5H_{14}NOCl)_2 + PtCl_4$
Pt	31.68%	31.79%	31.62%	31.64%.

Das alkoholische Filtrat von dem Platinchloridniederschlage wurde wie das entsprechende Filtrat aus A (s. oben) behandelt und gab ebenfalls ein Gemenge von Cholinplatinchlorid und von einem anderen, in kleinen orange-gelblichen Octaedern krystallisirenden Platindoppelsalz.

Dieses Gemenge wurde mit den übrigen entsprechenden Portionen zusammen untersucht, die aus den Krystallen von Cholinplatinchlorid mit kleinen Octaedern gemischt bestanden (s. oben). Die Krystalle von Cholinplatinchlorid wurden möglichst ausgelesen, das Uebrige zerrieben und mit wenig kaltem Wasser wiederholt ausgezogen, wobei ein schwer lösliches gelbes Pulver zurückblieb. Die Lösung wurde verdampft, der Rückstand wiederum mit wenig kaltem Wasser extrahirt und die beschriebene Behandlung nochmals wiederholt. Das schwer lösliche, in einer sehr geringen Menge erhaltene Pulver wurde aus heissem Wasser umkrystallisirt und in den erhaltenen Octaedern der Platingehalt bestimmt:

XIX. 0,0796 der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,0337 Pt, als PtS_2 abgeschieden.

	Gefunden:	Berechnet für:
	XIX.	$2 KCl + PtCl_4 \quad 2 NH_4Cl + PtCl_4$
Pt	42,34 %	40,10 % 43,91 %

Durch die qualitative Analyse der vom Platinsulfidniederschlage abfiltrirten Flüssigkeit wurde in der That die Gegenwart von Kalium-¹⁾ und Ammoniumchlorid ohne Beimischung von irgend einer organischen Substanz nachgewiesen.

Der Phosphormolybdänniederschlag wurde auf dieselbe Weise behandelt, wie der entsprechende Niederschlag, der aus den wässerigen Auszügen des Gehirns dargestellt wurde; der einzige Unterschied bestand darin, dass die Platinverbindung direkt, d. h. ohne vorherige Ueberführung des

1) Die Gegenwart von Kaliumsalzen in den alkoholischen Auszügen des Gehirns kann dadurch erklärt werden, dass durch die vorherige dreimalige Extraction des Gehirnbreies mit Wasser die Kaliumsalze nicht vollständig ausgezogen wurden; übrigens scheint ein Theil des Kaliums im Gehirn mit organischen Substanzen, namentlich mit dem Protagon, fester gebunden zu sein.

Chlorids in das Golddoppelsalz, dargestellt wurde. Der sehr geringe, aus der alkoholischen Flüssigkeit gefällte Niederschlag gab nur wenige Tafeln von Cholinplatinchlorid. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die organische Substanz mittelst absoluten Alkohols von den Mineralsalzen möglichst befreit und in das Golddoppelsalz übergeführt. Der sehr schmutzige Niederschlag desselben enthielt viel reducirtes Gold und amorphe, dunkelbraune, in heissem Wasser unlösliche Stoffe beigemischt. Aus der wässerigen Lösung des Niederschlages wurden zwei Fractionen von einem krystallinischen Golddoppelsalz erhalten, die nochmals aus wenig heissem Wasser zusammen umkrystallisirt wurden. Die ausgeschiedenen, ganz reinen, goldgelben Nadelchen wurden analysirt:

XX. 0,1786 der bei 110° getrockneten Substanz gaben 0,0793 Au, als Au_2S_3 abgeschieden; aus dem mit $CaCO_3$ eingedampften Filtrate davon wurden 0,2318 AgCl erhalten.

	Gefunden:	Berechnet für:
	XX.	$C_8H_{14}NOCl + AuCl_3$
Au	44,40%	44,49%
Cl	32,10%	32,01%

Das aus der von dem Chlorsilber abfiltrirten Flüssigkeit dargestellte Platindoppelsalz löste sich leicht in kaltem Wasser auf und schied sich in den für das Cholinplatinchlorid charakteristischen Krystallen aus.

Damit ist die Beschreibung der von mir ausgeführten chemischen Untersuchung des Gehirns geschlossen; ich hielt es für nothwendig, den Untersuchungsgang etwas ausführlicher zu schildern, um die Möglichkeit zur Beurtheilung freizustellen, ob nicht etwa das Neurin während der Arbeit übersehen werden konnte.

Die Resultate meiner Arbeit zusammenfassend möchte ich besonders folgende Punkte hervorheben:

1) Das vollkommen frische Ochsengehirn enthält kein Neurin, welches weder zwischen den Leukomatinen des Gehirns, noch unter den Verseifungsprodukten der complicirt zusammengesetzten Bestandtheile desselben gefunden werden konnte.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Angaben von Liebreich,¹⁾ der beim Kochen des von ihm entdeckten Protagonen mit Barytwasser aus den Zersetzungsprodukten auch das Neurin bekommen hat. Zur Aufklärung dieses Unterschiedes will ich darauf hinweisen, dass keiner von den späteren Forschern bei der Zersetzung von Gehirnbestandtheilen durch Kochen mit Barytwasser das Neurin isoliren konnte, sondern alle Untersuchungen des Gehirns zur Auffindung ausschliesslich des Cholins geführt haben und die Identität des Liebreich'schen Neurins mit dem Cholin festgestellt ist.²⁾ Da aber nur Liebreich mit reinem Protagon gearbeitet hat, während die übrigen eben erwähnten Verfasser die alkoholischen und die ätherischen Auszüge des Gehirns benutzt haben, in denen allerdings auch das Protagon, zum Theil wenigstens, enthalten sein sollte, so habe ich bei meinen Untersuchungen über das Protagon, die bei weitem noch nicht abgeschlossen sind, auch die Frage über die aus dem Protagon zu erhaltenden Basen berücksichtigt. An dieser Stelle sei nur kurz angegeben, dass ich bei der Zersetzung des Protagonen durch Natriumalkoholat, sowie durch Kochen mit Barythydrat kein Neurin, sondern Cholin bekommen habe.

1) O. Liebreich, Ann. der Chemie, Bd. 134, S. 29; Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 2, S. 12.

2) Ad. Baeyer, Ann. der Chemie, Bd. 140, S. 306; Bd. 142, S. 322.

Ad. Wurtz, Compd. rend., Bd. 65, S. 1015; Bd. 66, S. 772.

W. Dybkowsky, Journ. f. pr. Chem., Bd. 100, S. 153.

A. Claus u. C. Keesé, Ibid., Bd. 102, S. 24.

O. Schmiedeberg u. E. Harnack, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 6, S. 104.

Ob Thudichum aus den Zersetzungsprodukten der Gehirnbestandtheile Cholin oder Neurin isolirt hat, ist nicht so leicht zu sagen, da die von diesem Autor als Neurin bezeichnete Substanz die verschiedenartig und dabei merkwürdig construirten Formeln haben soll: die Zusammensetzung des Chlorids (einer Ammoniumbase!) wird durch $C_5H_{11}NO + HCl$ ($= C_5H_{14}NOCl = \text{Cholinchlorid}$), die der freien Base durch $C_5H_{12}NO$ ($= \text{Neurin}$), die des Neurinrestes durch $C_5H_{11}N$ (!) ausgedrückt. (Vgl. Thudichum, l. c., S. 42, 80, 86, 88, 111, 141, 146.) Es scheint auch dieses eigenartige Neurin nichts anderes als Cholin zu sein, ist es doch nach Thudichum (l. c. S. 156) mit dem Cholin der Galle identisch.

Die zwischen Liebreich und den übrigen Autoren existirende Meinungsverschiedenheit kann dadurch erklärt werden, dass Liebreich sicher kein reines Präparat von Cholinplatinchlorid analysirt hat, da er dieses Salz direkt, ohne irgend eine vorherige Reinigung, dargestellt hat. Dass dem Cholinplatinchlorid resp. Cholingoldchlorid sogar nach der vorhergehenden Ausscheidung des Cholins in Verbindung mit Quecksilberchlorid resp. mit Phosphorwolframsäure noch eine beträchtliche Menge von amorphen Verbindungen beigemischt sein kann, und dass das Cholinsalz von solchen Verbindungen bisweilen nur schwer zu trennen ist, habe ich in dieser Abhandlung schon angedeutet. Da aber die amorphen Platinverbindungen einen hohen Platingehalt haben können, so ist selbstverständlich, dass sie auch den Platingehalt des Cholinplatinchlorids bis zu dem des Neurinplatinchlorids leicht erhöhen können;¹⁾ Baeyer (l. c.) konnte z. B. bei der Analyse des Platindoppelsalzes von der aus dem Gehirn isolirten Base keine untereinander übereinstimmenden Zahlen bekommen, während die Analyse des Golddoppelsalzes die zur Formel des Cholingoldchlorids gut passenden Zahlen lieferte. Auch die von Liebreich angegebene Beschreibung seines Neurinplatinchlorids zeigt, dass er mit einer unreinen Substanz zu thun hatte: die Krystalle des Neurinplatinchlorids²⁾ wurden bald trüb und lösten sich in Wasser unter Zurücklassung eines unlöslichen Rückstandes, während die Lösung nun das Cholinplatinchlorid enthielt. Da, wie ich es schon früher erörtert habe,³⁾ das Neurinplatinchlorid beim Umkrystallisiren in das Cholinplatinchlorid nicht übergeht, so sollten in dem von

¹⁾ Es ist zu bemerken, dass in den von Liebreich angeführten analytischen Belegen nur der Platingehalt für die Formel des Neurinplatinchlorids stimmt, während die übrigen Werthe besser zu der des Cholinplatinchlorids passen.

²⁾ Nach Liebreich krystallisirt das Neurinplatinchlorid in gelben, übereinander geschobenen Tafeln, während diese für das Cholinplatinchlorid charakteristische Krystallisationsart dem Neurinplatinchlorid ganz fremd ist.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 188.

Liebreich dargestellten Neurinplatinchlorid noch Beimischungen enthalten sein.

2) Im wässerigen Extracte des Gehirns wurde das Cholin gefunden, dessen Menge etwa $\frac{1}{15}$ der Quantität von Cholin bildete, die aus dem mit Natriumalkoholat zersetzten alkoholischen Extracte des Gehirns gewonnen wurde. Die Frage, ob, das im wässerigen Extracte des Gehirns vorkommende Cholin den Leukomatinen des Gehirns zuzuzählen oder als ein Zersetzungsprodukt von einem Theil des Protagens resp. des Lecithins zu betrachten ist, lässt vorderhand keine Entscheidung treffen; wenn auch eine solche Abspaltung des Cholins von den complicirt zusammengesetzten Bestandtheilen des Gehirns bei der Bereitung vom wässerigen Extracte des Gehirns vorhanden ist, so hat sie — im Gegensatz zu der gewöhnlichen Annahme — nur ein geringes Maass, wie es auch die Arbeit von Brieger¹⁾ zeigt.

3) Ausser dem Cholin konnten aus dem wässerigen Extracte des Gehirns noch zwei besondere Leukomatine in einer sehr geringen Menge isolirt werden. Einer von diesen Körpern zeichnet sich durch den relativ niedrigen Schmelzpunkt seines Pikrates, sowie durch die Löslichkeit seines Platinchloriddoppelsalzes in Alkohol aus. Der Platingehalt (37,82%) des Platinchloriddoppelsalzes von dem zweiten Leukomatine steht dem (38,07%) des Chloroplatinates eines Diamins von der Formel $C_3H_{14}N_2$ nahe; leider war die erhaltene Menge der Substanz zu gering, um sogar eine Stickstoffbestimmung ausführen zu können.

4) Das wässrige Extract des Gehirns enthält den Harnstoff, welcher als ein Bestandtheil des Gehirns selbst zu betrachten ist, wie die einfache Berechnung zeigt.*) Die Menge

1) L. Brieger, Ueber Ptomaine. Berlin, 1885. S. 59 ff.

2) Wenn wir annehmen werden, dass der Harnstoffgehalt des Ochsenblutes etwa 0,02% gleich ist (F. Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie. Berlin, 1877—1881. S. 431), dann könnten 0,098 gr. des von mir aus dem Gehirn erhaltenen Harnstoffs nur aus 490 gr. Blut resultiren, und dieser Blutgehalt der Gehirne von entbluteten Thieren wäre 19,2% des gesammten Gehirngewichts (2550 gr.) entsprechend, während der Blutgehalt des Gehirns von nicht entbluteten Thieren nur zu

des im Gehirn enthaltenen Blutes ist, zumal beim verbluteten Thier, viel zu gering, um etwa die Annahme zu gestatten, dass dieser Harnstoff aus dem Blute stammt.

5) Die einzige bei der Verseifung des alkoholischen Extracts von Gehirn erhaltene organische Base war Cholin.

6) Die Löslichkeit der Doppelsalze von organischen Basen kann, wie ich schon früher gelegentlich erwähnt habe,¹⁾ durch die Gegenwart von Beimengungen beträchtlich verändert, namentlich vergrößert werden. So habe ich z. B. des grossen Ueberschusses von hinzugefügtem Quecksilberchlorid ungeachtet fast die Hälfte der ganzen im wässerigen Gehirnextracte vorhandenen Menge von Cholin im alkoholischen Filtrate von dem Quecksilberchloridniederschlage gefunden, während reines Cholinquecksilberchlorid in Alkohol so gut wie gar nicht löslich ist. Desgleichen kann sich auch das im starken Alkohol absolut unlösliche Cholinplatinchlorid in Gegenwart von Beimischungen, besonders, wie es scheint, von Natriumacetat, darin beträchtlich lösen (S. 78).

Indem ich diese Abhandlung²⁾ schliesse, ergreife ich freudig die Gelegenheit, eine angenehme Pflicht zu erfüllen, indem ich meinem hochverehrten Lehrer und Meister, Herrn Professor Dr. A. Buliginsky, in dessen Laboratorium meine Arbeit ausgeführt wurde, für seine schätzbaren Rathschläge, sowie für die grosse Liberalität, mit der er mir alles für meine Arbeit Nothwendige zur Verfügung stellte, meinen wärmsten und aufrichtigsten Dank öffentlich abstatte.

Marburg a. L., den 7. Februar 1899.

etwa 5,5% des gesammten Gewichts desselben angenommen wird. Dabei sind noch die bei der Arbeit unvermeidlichen Verluste des Harnstoffs nicht berücksichtigt.

1) Diese Zeitschr., Bd. XX. S. 301.

2) Diese wie auch meine zwei früher publicirten Abhandlungen (diese Zeitschr. Bd. XXIV S. 513, Bd. XXVI S. 175) bilden einen Theil meiner vor drei Jahren veröffentlichten Monographie: Wl. Gulewitsch. Ueber Cholin und Neurin. Materialien zur chem. Untersuchung des Gehirns. Moskau, 1896. IV + 225 (Russisch).

Beiträge zur qualitativen und quantitativen Gallenfarbstoffbestimmung im Harn.

Von

Dr. Adolf Jolles,

Docent am k. k. Technologischen Gewerbemuseum in Wien.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. u. Dr. Ad. Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 9. Februar 1899.)

In dieser Zeitschrift¹⁾ habe ich im Jahre 1894 die verschiedenen zum Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn in Vorschlag gebrachten Proben einer vergleichenden quantitativen Bewerthung unterzogen und hieran anschliessend ein Verfahren zum Nachweise sehr geringer Gallenfarbstoffmengen im Harne empfohlen, welches im Princip darauf basirte, die in einer relativ grösseren Harnquantität eventuell vorhandene Bilirubinmenge möglichst vollständig zu isoliren. Immanuel Munk²⁾ hat nun neuerdings die absoluten Empfindlichkeitsgrenzen der einzelnen Gallenfarbstoffproben einer Prüfung unterzogen, indem er in einem Volumen Harn eine genau abgewogene Bilirubinmenge auflöste und durch Verdünnen dieses Harnes mit einem gallenfarbstofffreien Harn die untersten positiven Grenzen festgestellt hat. Munk hat im Wesentlichen die von mir bereits festgestellten Thatsachen bezüglich der Brauchbarkeit der diversen Gallenfarbstoffproben bestätigt gefunden, nur bezüglich des Empfindlichkeitsgrades ist Munk zu abweichenden Resultaten

1) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XVIII und Bd. XX.

2) Archiv für Anatomie und Physiologie, 1898.

gelangt. Letztere Thatsache ist durchaus nicht auffallend, wenn man erwägt, dass die Empfindlichkeitsgrenze der Gallenfarbstoffproben wesentlich von der Art der Harne abhängt, die zum Verdünnen verwendet werden. Munk hat aber als Verdünnungsmittel einen normalen Menschenharn in Anwendung gebracht. Es ist eine bekannte Thatsache, dass sowohl normale Harnbestandtheile, sobald sie eine gewisse Concentration überschreiten, als auch namentlich pathologische Bestandtheile die Empfindlichkeit der Harnproben im Allgemeinen und der Gallenfarbstoffproben im Speciellen mehr oder minder ungünstig beeinflussen, so dass in einem Gallenharne, zu dessen Verdünnung ein Harn vom specifischen Gewichte 1,015 verwendet wurde, eine Probe sehr deutlich positiv ausfallen kann, während dieselbe Probe versagt, wenn zur gleichen Verdünnung des Gallenharnes ein concentrirter Harn vom specifischen Gewicht 1,030 zur Verwendung gelangt. Nach meinen reichlichen Erfahrungen bin ich überzeugt, dass man über die Brauchbarkeit und Empfindlichkeit einer Harnprobe nur auf Grund umfassender Versuche mit verschiedenen zusammengesetzten Harnen zu einem abschliessenden Urtheile gelangt, dass hingegen Versuche, welche nicht die verschiedenen Modificationen der Harne berücksichtigen, naturgemäss zu einseitigen Beurtheilungen einer Probe führen können. Erst im vorigen Jahre haben Krokiewicz und Batko in der «Wiener klinischen Wochenschrift» (1898, Seite 173) mehrere Modificationen der Ehrlich'schen Methode als sehr empfindliche Gallenfarbstoffproben empfohlen, welche jedoch, wie ich gezeigt habe,¹⁾ nicht nur nicht das Prädikat «empfindlich» verdienen, sondern als Gallenfarbstoffproben für Harne überhaupt nicht in Betracht gezogen werden können. Die Ursache dieser so wesentlich verschiedenen Beurtheilung hinsichtlich der Empfindlichkeit sind in erster Linie darauf zurückzuführen, dass die Verfasser bei der Prüfung der Empfindlichkeit ihrer Proben zur entsprechenden Verdünnung der Gallen Harne von sehr niedrigem specifischen Gewichte (1,004 bis 1,007) verwendet haben.

1) Wiener medicinische Wochenschrift Nr. 17, 1898.

Bei den Versuchen von Munk kommt aber überdies noch in Betracht, dass das Bilirubin in einer Sodasolution gelöst und diese Mischung zu einem vorher alkalisch gemachten und von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirten Harne hinzugefügt wurde. Hierdurch erleidet der normale Harn, dessen sich Munk bediente, eine wesentliche Verdünnung und Veränderung und die mit einem solchen Harne constatirten Empfindlichkeitsgrenzen können auf allgemeine Giltigkeit keinen Anspruch haben. Leider hat Munk die von mir in Vorschlag gebrachte Gallenfarbstoffprobe einer Nachprüfung auf ihre Empfindlichkeitsgrenze nicht unterzogen, vermuthlich weil ihre Ausführung, besonders die Abscheidung mittelst des Schüttelcylinders, ihm als zu umständlich erschienen ist.

Nichtsdestoweniger dürfte meine Probe in allen den Fällen, wo es sich darum handelt, sehr geringe Gallenfarbstoffmengen im Harne einwandfrei und sicher nachzuweisen, wohl als die alleinige in Betracht kommen, nachdem ich wiederholt im Harne Spuren von Gallenfarbstoff mit Sicherheit constatirt habe, die mit den üblichen Proben nicht nachweisbar waren.¹⁾ Um nun meiner Probe eine weitere Verbreitung namentlich in praxi zu sichern, war ich bemüht, dieselbe in der Ausführung zu vereinfachen, indem ich das Princip der Methode, nämlich die Isolirung des Gallenfarbstoffs durch Combination von Extraction und Fällung, beibehalte, hingegen den Nachweis einfach mit Hübl'scher Jodlösung durchführe, welche sich, worauf ich noch später zurückkomme, als ein vorzügliches Oxydationsmittel für Bilirubin erwiesen hat. Auf Grund zahlreicher Versuche empfehle ich die Probe in folgender Ausführung:

Etwa 10 ccm. Harn werden mit ca. 1 ccm. Chloroform und 4—5 ccm. einer 10%igen Chlorbaryumlösung versetzt, kräftig geschüttelt und einige Minuten der Ruhe überlassen. Hierauf wird die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit

¹⁾ Dr. Ed. Spaeth bezeichnet in seinem Handbuche: «Die chemische und mikroskopische Untersuchung des Harnes», Verlag von J. A. Barth, Leipzig 1897, meine Methode als eine sehr empfindliche.

abpipetirt oder eventuell vorsichtig abgegossen, der Rückstand mit 2—3 ccm. einer ca. $\frac{n}{100}$ Hübl'schen Jodlösung¹⁾ und etwa 1 ccm. concentrirter Salzsäure versetzt, kräftig geschüttelt und absitzen gelassen. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoff erscheint der Niederschlag, die Chloroformlösung und die über derselben stehende Flüssigkeit grün bis grünlichblau gefärbt. Bei geringen Spuren von Gallenfarbstoff ist nur der Niederschlag grünlich gefärbt. — Aus nachstehenden, unter verschiedenen Verhältnissen ausgeführten Empfindlichkeitsproben geht die gleichmässige Verlässlichkeit und Empfindlichkeit der Probe zur Genüge hervor.

Versuche mit Bilirubinzusatz.

0,005 gr. Bilirubin wurden in 15 ccm. einer 10%igen Sodalösung gelöst und mit einem Harn vom specifischen Gewichte 1,020, der vorher mit Soda alkalisch gemacht und filtrirt wurde, auf 100 ccm. aufgefüllt. Zu diesem Bilirubin-harn wurden wechselnde Mengen eines sehr stark concentrirten Harnes vom specifischen Gewichte 1,0325 zugefügt und die Empfindlichkeit der Huppert'schen Methode in der von Sal-kowski²⁾ vorgeschlagenen Form, sowie der meinigen festgestellt.

Huppert Jolles

I.	20 ccm. Bilirubinharn	+ 80 ccm. conc. Harn, entsprechend 1 mgr. % Bilirubin	positiv,	positiv.
II.	10 „	+ 90 „ „ „ „ 0,5 „ „ „	noch positiv,	„
III.	8 „	+ 92 „ „ „ „ 0,4 „ „ „	negativ,	„
IV.	6 „	+ 94 „ „ „ „ 0,3 „ „ „	„	„
V.	4 „	+ 96 „ „ „ „ 0,2 „ „ „	„	noch positiv.*)
VI.	2 „	+ 98 „ „ „ „ 0,1 „ „ „	„	negativ.

1) Zur Darstellung der Jodlösung werden einerseits 0,13 gr. Jod, andererseits 0,16 gr. Quecksilberchlorid in je 100 ccm. 95 %igen Alkohols gelöst und sodann beide Lösungen vereinigt.

2) Praktikum der physiologischen und pathologischen Chemie, Berlin 1893. S. 226.

*) Bei den untersten Grenzen empfiehlt es sich zur besseren Erkennung der grünen Färbung, die Eprouvette gegen das Licht zu halten und überdies die Färbung am Boden des Reagensglases zu beobachten.

Versuche mit icterischem Harne.

A.

50 ccm. eines icterischen Harnes wurden mit einem normalen Harne vom specifischen Gewichte 1,021 auf 300 ccm. aufgefüllt. Hiervon wurden verschiedene Quantitäten mit verschiedenen Mengen desselben normalen Harnes verdünnt.

						Huppert	Jolles
1.	80 ccm. ict. Harn	+	20 ccm. norm. Harn			positiv,	positiv.
2.	60 „ „ „	+	40 „ „ „			„	„
3.	40 „ „ „	+	60 „ „ „			„	„
4.	30 „ „ „	+	70 „ „ „			„	„
5.	20 „ „ „	+	80 „ „ „			noch positiv,	„
6.	15 „ „ „	+	85 „ „ „			negativ,	noch positiv.*)
7.	10 „ „ „	+	90 „ „ „			„	negativ.

B.

50 ccm. eines icterischen Harnes wurden mit einem sehr stark concentrirten Harn vom specifischen Gewichte 1,0325 auf 300 ccm. aufgefüllt. Hiervon wurden verschiedene Quantitäten mit verschiedenen Mengen desselben concentrirten Harnes verdünnt.

						Huppert	Jolles
1.	80 ccm. ict. Harn	+	20 ccm. conc. Harn			positiv,	positiv.
2.	60 „ „ „	+	40 „ „ „			noch positiv,	„
3.	40 „ „ „	+	60 „ „ „			kaum noch zu erkennen,	„
4.	30 „ „ „	+	70 „ „ „			negativ,	„
5.	20 „ „ „	+	80 „ „ „			„	noch positiv.
6.	15 „ „ „	+	85 „ „ „			„	negativ.
7.	10 „ „ „	+	90 „ „ „			„	„

Quantitative Methode zur Bestimmung des Bilirubins im Harne mittelst alkoholischer Jodlösung.

Auf Grund der von mir bereits früher festgestellten Thatsache, dass Bilirubin bei Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen durch Einwirkung alkoholischer Jodlösung in einen grünen Farbstoff übergeführt wird, wobei auf 1 Molekül Bilirubin von der Zusammensetzung $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ — 2 Atome Jod verbraucht werden, habe ich s. Z. eine Methode zur annähernd

*) Siehe Anmerkung auf Seite 86.

quantitativen Gallenfarbstoffbestimmung im Harne in Vorschlag gebracht.¹⁾ Nachdem nunmehr — wie aus meiner vor Kurzem der Akademie der Wissenschaften in Wien überreichten Abhandlung «Ueber die Einwirkung von Jodlösungen auf Bilirubin und über eine quantitative Methode zur Bestimmung desselben im Harn» hervorgeht — der Verlauf des Processes als Oxydationsvorgang mit Sicherheit festgestellt erscheint, habe ich die Methodik der Bilirubinbestimmung im Harne einer exacteren Bearbeitung unterzogen und gestatte mir, auf Grund zahlreicher Versuche nachstehende quantitative Methode für Harne zu empfehlen: Es werden von gallenfarbstoffreichen Harnen 10 ccm., von gallenfarbstoffarmen Harnen 20 ccm. genau abgemessen und in einen Schüttelcylinder von etwa 200 ccm. Inhalt gebracht, der am Boden eine birnenförmige Gestalt und ein möglichst kurzes Ausflussrohr besitzt. Zu dem Harne setzt man 20 ccm. Chloroform, 10 ccm. 10%ige Chlorbaryumlösung und 50 ccm. Salzsäure (1 : 5) hinzu und schüttelt das Ganze mehrere Minuten kräftig durch.²⁾ Nach erfolgtem Absitzenlassen lässt man 15 ccm. von der Chloroformlösung in einen geeichten Schüttelcylinder (ca. 25 cm. Höhe und 3 cm. Weite) abfließen. Da in dem kurzen Ausflussrohre einige Tropfen der Chloroformlösung zurückbleiben, empfiehlt es sich, den geschlossenen Schüttelcylinder umzudrehen und durch Oeffnen des Hahnes die minimale Chloroformmenge in den Schüttelcylinder zurückfließen zu lassen. Hierauf bringt man weitere 15 ccm. Chloroform in den Schüttelapparat, schüttelt kräftig durch, lässt absitzen und hierauf 12 ccm. der Chloroformlösung in den Standcylinder abfließen. Nunmehr setzt man 10 ccm. Chloroform von Neuem hinzu und nach erfolgtem Schütteln und Absetzenlassen lässt man 8 ccm. der Chloroformlösung abfließen. Nach diesem Vorgange hat man die gesammte Gallenfarbstoffmenge aus der in Arbeit genommenen Harnmenge extrahirt. Da stets Spuren

1) Wiener medicinische Wochenschrift Nr. 20 u. 21, 1894.

2) Der Salzsäurezusatz hat den Zweck, einerseits den Niederschlag zu verringern, andererseits die Lösung so zu verdünnen, dass mit dem Niederschlage weniger Harn mitgerissen wird.

von Harn durch den mit dem Chloroform abgehenden Niederschlag mitgerissen werden, wodurch in Folge der Jodaufnahme des Harns unrichtige Ergebnisse resultiren würden, empfiehlt es sich, den Inhalt des Standcylinders mit ca. 30 ccm. Salzsäure (1 : 1) zweimal auszuwaschen. Dies geschieht in der Weise, dass man in den Cylinder 30 ccm. Salzsäure bringt, wiederholt umrührt, absetzen lässt und nunmehr ca. 25 ccm. der über dem Niederschlage befindlichen fast klaren Flüssigkeit abpipettirt. Das Abpipetiren kann entweder in der Weise geschehen, dass man mittelst einer Pipette, die mit einem Stückchen Schlauch und Quetschhahn versehen ist, die über dem Niederschlage befindliche klare Flüssigkeit aufsaugt, hierauf den Quetschhahn schliesst, einige Minuten der Ruhe überlässt, wobei etwaige Spuren des aufgesaugten Niederschlages sich in der Ausflussöffnung der Pipette ansammeln, die man hierauf durch langsames Oeffnen des Quetschhahnes ausfliessen lässt, — oder man geht in der Weise vor, dass man die über dem Niederschlage befindliche Flüssigkeit mittelst einer Vorrichtung ähnlich jener bei einer Spritzflasche leicht und bequem entfernt. Diese Manipulation — Zusatz von 30 ccm. Salzsäure (1 : 1), Schütteln und Abpipetiren — wird noch einmal wiederholt und dann der Inhalt des Standcylinders in eine Stöpselflasche gebracht, hierauf der Cylinder zweimal mit je 25 ccm. Alkohol nachgewaschen — um den an den Glaswänden anhaftenden Niederschlag vollkommen zu entfernen — und diese Waschflüssigkeit der Hauptmenge zugefügt. Hierauf setzt man 10 ccm. einer ca. $\frac{n}{100}$ Hübl'schen Jodlösung²⁾

1) Die salzsäurehaltigen Waschwässer wurden wiederholt mit 10 ccm. Chloroform ausgeschüttelt, das Chloroform in eine kleine Reagensflasche gebracht und mit $\frac{n}{100}$ Hübl'scher Jodlösung oxydirt. Es wurde hierbei in keinem Falle mehr als eine einer 0,1 ccm. ca. $\frac{1}{100}$ $n\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung äquivalenten Jodmenge verbraucht, so dass durch das zweimalige Auswaschen mit Salzsäure fast gar kein Farbstoff entzogen wird.

2) **Darstellung der ca. $\frac{n}{100}$ Hübl'schen Jodlösung:** Es werden einerseits 0,64 gr. Jod, andererseits 0,8 gr. Quecksilberchlorid in je 250 ccm. 95 %igen, fusselfreien Alkohols gelöst, letztere Lösung, wenn nöthig, filtrirt und sodann beide Lösungen vereinigt. Die Flüssigkeit darf erst nach etwa zehnstündigem Stehen in Gebrauch genommen werden,

hinzu, schüttelt etwa 5 Minuten öfters durch, setzt dann etwa 5 ccm. einer 10%igen Jodkalilösung und 5 ccm. einer frisch hergestellten Stärkelösung,¹⁾ sowie etwa 100 ccm. destillirtes Wasser hinzu, schüttelt einige Male kräftig durch und titirt mit ca. $\frac{n}{100}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung wieder zurück, bis die über dem Chloroform stehende rothbraune Flüssigkeit nach jeweiligem Zusatze von Natriumthiosulfat, Durchschütteln und Absitzenlassen vollkommen entfärbt erscheint. Gegen den Schluss der Titration giesst man, um den Endpunkt deutlich zu erkennen, je ca. 2—3 ccm. von der nach dem Absitzen über dem Chloroform stehenden Flüssigkeit in 2 Eprouvetten, setzt zu der einen ca. 0,3 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung hinzu, schüttelt um und vergleicht die Färbungen in den beiden Reagensgläsern. Erscheint die Flüssigkeit in der einen Eprouvette lichter gefärbt, so giesst man den Inhalt der Eprouvetten zurück, schüttelt um und wiederholt diesen Vorgang so oft, bis die Färbungen in den Reagensgläsern nach Zusatz einiger Tropfen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung ganz gleich erscheinen. Alsdann ist die Titration beendet. Bei Einhaltung der angegebenen Bedingungen kann man die Titration ziemlich genau durchführen und der Fehler beträgt höchstens ca. 0,1 ccm. einer ca. $\frac{1}{100}$ n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Methode erfordert zu ihrer Ausführung etwa 1—1½ Stunden.

A. Versuche mit künstlich hergestellten Bilirubinarnen.

Versuchsreihe 1.

0,0228 gr. Bilirubin wurden in etwa 30 ccm. einer 10%igen Sodalösung gelöst und mit einem mit Sodalösung alkalisch gemachten normalen Harne (specifisches Gewicht 1,0205 bei 15° C.) auf 200 ccm. aufgefällt. Von dieser Lösung (A) wurden verschiedene Quantitäten entnommen und der Gallenfarbstoffgehalt quantitativ bestimmt.

da sich der Titer Anfangs rasch ändert. Es empfiehlt sich, vor jeder neuen Versuchsreihe den Titer neu zu stellen.

¹⁾ Durch den Zusatz der Stärke entsteht keine Blaufärbung, sondern eine rothbraune Färbung, die nach starkem Verdünnen mit Wasser in eine Blauviolettärbung übergeht, welche das Titiren wesentlich erleichtert.

1. 10 ccm. der Lösung A wurden in einen Scheidetrichter gebracht, 20 ccm. Chloroform und 5 ccm. einer 10%igen Chlorbaryumlösung zugesetzt, ausgeschüttelt, 10 ccm. des gelbgrün gefärbten Niederschlages in einen Messcylinder abgelassen und diese Manipulation noch zweimal wiederholt. Der Inhalt des Messcylinders wurde in eine Reagensflasche gebracht, der Messcylinder mit Alkohol nachgespült, hierauf 10 ccm. Salzsäure (1 : 3) zugesetzt und geschüttelt. Hierauf wurden 5 ccm. einer ca. n_{100} Hübl'schen Jodlösung zugesetzt, 5 Minuten geschüttelt und nach Zusatz von ca. 2 ccm. einer 10%igen Jodkaliumlösung und Stärke mit unterschwefligsaurem Natron (ca. n_{100}) zurücktitriert.

Die Titration ist beendet, sobald die über dem Chloroform befindliche Lösung farblos erscheint; das Chloroform selbst ist am Schlusse der Reaction zinnobergrün gefärbt.

1) 10 ccm. Harn enthalten 0,00114 gr. Bilirubin.

Hinzugefügt wurden 5 ccm. Jodlösung = 8,3 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung

Zurücktitriert 7,1 „ „ (Mittel aus 4 Titrationen).

1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,0008639 gr. Jod.

Es wurden verbraucht 1,2 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,001037 gr. Jod.

Bilirubin in Liter	{	vorhanden: 0,114 gr.
		gefunden: 0,117 „
		Differenz: 0,003 gr. pro Liter.

2) 10 ccm. Harn.

Verbraucht 1,2 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,001037 gr. Jod.

Bilirubin in Liter	{	vorhanden: 0,114 gr.
		gefunden: 0,117 „
		Differenz: 0,003 gr.

3) 15 ccm. Harn,

Verbraucht 1,75 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,001512 gr. Jod.

Bilirubin in Liter	{	vorhanden: 0,114 gr.
		gefunden: 0,113 „
		Differenz: 0,001 gr. pro Liter.

4) 15 ccm. Harn.

Verbraucht 1,8 cmm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,001555 gr. Jod.

Bilirubin in Liter	{	vorhanden: 0,114 gr.
		gefunden: 0,117 „
		Differenz: 0,003 gr. pro Liter.

5) 20 ccm. Harn.

Verbraucht 2,45 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,002116 gr. Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden: } 0,114 \text{ gr.} \\ \text{gefunden: } 0,121 \text{ „} \end{array} \right.$
Differenz: 0,007 gr. pro Liter.

6) 20 ccm. Harn.

Verbraucht 2,4 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,0020734 gr. Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden: } 0,114 \text{ gr.} \\ \text{gefunden: } 0,117 \text{ „} \end{array} \right.$
Differenz: 0,003 gr. pro Liter.

7) 30 ccm.³ Harn.

Verbraucht 3,6 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,00311 gr. Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden: } 0,114 \text{ gr.} \\ \text{gefunden: } 0,117 \text{ „} \end{array} \right.$
Differenz: 0,003 gr. pro Liter.

8) 30 ccm. Harn.

Verbraucht 3,55 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,003067 gr. Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden: } 0,114 \text{ gr.} \\ \text{gefunden: } 0,115 \text{ „} \end{array} \right.$
Differenz: 0,001 gr. pro Liter.

9) 40 ccm. Harn.

Verbraucht 4,7 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,00406 gr. Jod.

Bilirubin in Liter $\left\{ \begin{array}{l} \text{vorhanden: } 0,114 \text{ gr.} \\ \text{gefunden: } 0,114 \text{ „} \end{array} \right.$
Differenz: 0,000 gr. pro Liter.

Versuchsreihe 2.

0,01 gr. Bilirubin wurden in 12 ccm. 10%iger Soda-
lösung gelöst und mit einem — vorher mit 10%iger Soda-
lösung alkalisch gemachten — sehr stark concentrirten Harne
vom specifischen Gewichte 1,032 auf 100 ccm. aufgefüllt.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammen-
gestellt:

Angewandte Harmmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter Harn		
		vorhanden	gefunden	Differenz pro Liter
10 ccm.	0,00109 gr.	0,100 gr.	0,109 gr.	0,009 gr.
10 „	0,00108 „	0,100 „	0,108 „	0,008 „
20 „	0,00212 „	0,100 „	0,106 „	0,006 „
20 „	0,00216 „	0,100 „	0,108 „	0,008 „
30 „	0,00318 „	0,100 „	0,106 „	0,006 „

Versuchsreihe 3.

Icterischer Harn. Specifisches Gewicht 1 · 024, enthaltend Albumin und Nucleoalbumin in Spuren, sonst keine pathologischen Elemente.

Der Gallenfarbstoff wurde in angegebener Weise extrahiert, 10 ccm. ca. n/100 Hübl'sche Jodlösung hinzugefügt und mit Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

Die Resultate sind in nachstehender Tabelle angeführt:

Angewandte Harnmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter (gerechnet)	Differenz gegen das Mittel von 0,106
10 ccm.	0,00107 gr.	0,107 gr.	+ 0,001
10 „	0,00107 „	0,107 „	+ 0,001
20 „	0,00214 „	0,107 „	+ 0,001
20 „	0,00214 „	0,107 „	+ 0,001
30 „	0,00311 „	0,104 „	— 0,002
30 „	0,00311 „	0,104 „	— 0,002

Versuchsreihe 4.

Icterischer Harn. Specifisches Gewicht 1 · 032, enthaltend Traubenzucker 9 gr. pro Liter; Harnsäure in bedeutendem Ueberschusse: 1 · 23 gr. pro Liter; (Relation zwischen Harnsäure und Harnstoff 1:21,8); Indican stark vermehrt; (Relation zwischen der gepaarten zur gesammten Schwefelsäure 1:7); Albumin in geringen Mengen 0,3 gr. pro Liter. — Der mikroskopische Befund ergab die Anwesenheit einzelner scharf contourirter hyaliner Cylinder.

Die Ergebnisse der Titration sind in nachstehender Tabelle verzeichnet:

Angewandte Harnmenge	Bilirubin gefunden	Bilirubin pro Liter (gerechnet)	Differenz gegen das Mittel von 0,258
10 ccm.	0,00248 gr.	0,248 gr.	— 0,010
10 „	0,00262 „	0,262 „	+ 0,004
20 „	0,00531 „	0,265 „	+ 0,007
20 „	0,00515 „	0,256 „	— 0,001

Fassen wir die analytischen Ergebnisse zusammen, so resultirt, dass die Methode ziemlich befriedigende Resultate liefert, und zwar ganz besonders bei nicht zu stark concentrirten Harnen. Jedoch bewegen sich auch in letzterem Falle die Differenzen in solchen Grenzen, dass die Methode zur quantitativen Bestimmung des Bilirubins in Harnen für klinische und physiologisch-chemische Zwecke als eine vollkommen geeignete bezeichnet werden kann.

Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül.

Von

Cand. med. **Walther Hausmann** (aus Meran).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge. Nr. 18.)

(Der Redaction zugegangen am 14. Februar 1899.)

Die Merkmale, die uns derzeit für die Unterscheidung der einzelnen Eiweissstoffe, als Albumine, Globuline, Vitelline, Caseine u. s. w., zur Verfügung stehen, betreffen zum grössten Theile Eigenschaften, die von der Constitution dieser Stoffe anscheinend unabhängig sind. In neuerer Zeit pflegt man daher mit Recht gerade auf jene Reactionen erhöhtes Gewicht zu legen, welche, wie die Abspaltbarkeit von Schwefel- oder Nucleingruppen, die Millon'sche Probe, die Furfurolreactionen, einen mehr oder minder sicheren Hinweis auf constitutionelle Verschiedenheiten geben.

Nun ist es durch eine Reihe mühevoller Untersuchungen nach und nach gelungen, die wesentlichen Spaltungsprodukte der Eiweisskörper klar zu legen. Für die physiologische Verwerthung kann aber diese Erkenntniss nur dadurch fruchtbar gemacht werden, dass man über das Vorkommen der die Eiweisskörper constituirenden Gruppen nicht bloss qualitativ, sondern auch quantitativ Aufschluss erhält. Quantitative Zerlegung der Eiweisskörper, namentlich durch Einwirkung von Säuren, haben vor Allem Hlasiwetz und Habermann,¹⁾ in jüngster Zeit wieder R. Cohn²⁾ angestrebt.

Aber selbst wenn auf diesem Wege durch möglichste Isolirung der einzelnen krystallisirten Spaltungsprodukte das gesteckte Ziel erreichbar sein sollte, so bleibt ein solches Verfahren doch nur dort anwendbar, wo das Ausgangsmaterial in erheblichen Mengen zugänglich ist. Ueberdies setzt es monatelange Arbeit behufs Trennung und Reinigung der ein-

1) Annalen der Chem. u. Pharm., Bd. 169, S. 50.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII. S. 153 u. Bd. XXVI. S. 395.

zelenen Spaltungsprodukte voraus. In Fällen, wo die Eiweissstoffe nur in geringer Quantität, grammweise, zur Verfügung stehen, ist auf diesem Wege höchstens qualitativer Aufschluss zu erreichen.

Man kann aber einen gewissen orientirenden Einblick in die Zusammensetzung eines Eiweisskörpers auch erhalten, ohne die einzelnen Spaltungsprodukte isolirt und gewogen zu haben, wenn man die verschiedene Bindungsweise des Stickstoffes in demselben genauer bestimmt. Soweit alle bisher ausgeführten Spaltungen der Eiweisskörper lehren, enthalten sie den Stickstoff 1) in einer Form, die bei Einwirkung von Säuren und Alkali leicht zur Bildung von Ammoniaksalz Veranlassung gibt, Amidstickstoff (Ammoniakstickstoff, locker gebundener Stickstoff); 2) in einer Form, in der er durch Säuren gar nicht, durch Alkali nur allmählich und unvollkommen abgespalten wird, und zwar ist das der Stickstoff der Amino- und Diaminosäuren (resp. ihrer Derivate). Dieser lässt sich wieder trennen in solchen, der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen angehört, also der Diaminocapronsäure (Lysin), Guanidinaminovaleriansäure (Arginin) und dem Histidin — ich will diesen Stickstoff vorläufig kurz Diaminostickstoff nennen —, und in solchen, der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Verbindungen angehört, d. h. den die grosse Masse der Eiweisskörper darstellenden Monamino-säuren, dem Leucin, Tyrosin, der Asparaginsäure, Glutaminsäure u. a. (Monaminostickstoff).

Aehnlich nun der Bestimmung des Schwefels lässt sich auch die Bestimmung der Bindungsweise des Stickstoffes im Eiweissmolekül für die Charakterisirung der einzelnen Eiweisskörper benutzen. Die so gewonnenen Daten sind schon deshalb von Wichtigkeit, weil sie einen annähernd quantitativen Ueberblick über die Mengen der wichtigsten Spaltungsprodukte auf kurzem Wege ermöglichen.

Ich bin daher auf Wunsch von Herrn Professor Hofmeister im verflossenen Sommersemester daran gegangen, einige Proteinstoffe der genaueren Untersuchung in dieser Richtung zu unterziehen, indem ich in ihnen die Mengen des

Amid-, Diamino- und Monaminostickstoffes nach Möglichkeit genau bestimmte. Für eine solche Untersuchung war auch insofern die Gelegenheit günstig, als zur Zeit wenigstens einzelne Eiweissstoffe in ausreichend reinem, zum Theil krystallisirtem Zustande zugänglich geworden sind. Ich habe damit einen Weg weiter verfolgt, der, im Anschluss an die Erfahrungen von Hlasiwetz und Habermann, von O. Nasse¹⁾ in ausführlichen Versuchen eingeschlagen worden ist. Nasse bestimmte an verschiedenen Eiweisskörpern und Produkten, die er aus ihnen durch Einwirkung von Säuren oder Alkali erhielt, den Gehalt an «locker gebundenem» Stickstoff. Dabei erwies sich das Austreiben desselben durch Kochen mit Baryt als nicht entsprechend, weil Baryt allmählich auch fester gebundenen Stickstoff angreift (vermuthlich zunächst jenen der -CNH-NH₂-Gruppen). Wohl aber erhielt er übereinstimmende Werthe, wenn er zuerst mit siedender Salzsäure zersetzte und das abgespaltene Ammoniak nach Zusatz von Baryumhydroxyd abdestillirte.

Die Bestimmung der Bindungsweise des übrigen Stickstoffes ist erst in neuester Zeit gelegentlich von E. Schulze²⁾ bei Untersuchung der Spaltungsprodukte von pflanzlichen Eiweisskörpern durchgeführt worden, behufs quantitativer Ermittelung der vorhandenen Diaminosäuren. An reinen thierischen Eiweissstoffen sind ähnliche Untersuchungen meines Wissens überhaupt noch nicht ausgeführt.

Ich habe für meine Untersuchung herangezogen: krystallisirtes Eialbumin, krystallisirtes Serumalbumin, Serumglobulin, Casein und Leim.

Versuchsanordnung.

Die Untersuchung gliederte sich in jedem Falle: 1) in Spaltung des Eiweisskörpers mit siedender concentrirter Salzsäure, 2) Bestimmung des Amidstickstoffes durch Abdestilliren des gebildeten Ammoniaks mit Magnesia, 3) Fällung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen und Bestimmung des in den Niederschlag gegangenen Stickstoffs nach Kjeldahl,

1) Pflüger's Archiv, Bd. VI, S. 589 u. Bd. VII, S. 139.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276 u. Bd. XXV, S. 360.

4) Bestimmung des durch Magnesia nicht austreibbaren, durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffs nach Kjeldahl.

Das dabei von mir benutzte Verfahren war im Einzelnen das Folgende:

Ca. 1 gr. der trockenen Substanz wurde in einem Kolben mit Steigrohr mit etwa 20 ccm. concentrirter Salzsäure fünf Stunden lang im Sieden erhalten. Ich habe mich überzeugt, dass längere Säureeinwirkung an den Resultaten nichts ändert. Hingegen dürfte allzu kurzes Kochen zu vermeiden sein, weil sonst Gefahr vorliegt, dass etwa entstandene Albumosen und Peptone der Zersetzung entgehen und hinterher in den Phosphorwolframsäureniederschlag übergehen.

Zum Austreiben des in der Lösung als Chlorammonium vorhandenen Ammoniaks wurde Magnesia benutzt, wie dies abweichend von O. Nasse schon E. Schulze gethan hat, um eine weitere Abspaltung von Stickstoff, wie sie durch Baryt eintreten könnte, zu vermeiden. Die Magnesia wurde vorher in kleinen Portionen geglüht, dann in einen Destillationskolben mit Wasser gebracht und eine Stunde lang im Sieden erhalten, um jede Spur von etwa vorhandenem Ammoniak zu vertreiben. Sodann wurde die auf ein geringes Volumen eingedampfte Flüssigkeit erkalten gelassen und die vorher im Becherglase mit Magnesia vorsichtig neutralisirte Zersetzungsflüssigkeit hinzugefügt. Es empfiehlt sich, langsam unter Abkühlen zu neutralisiren, um einen Stickstoffverlust in Folge von Erwärmung der Flüssigkeit zu vermeiden. Die in den Kolben gebrachte Flüssigkeit wurde der Destillation unterworfen, das entweichende Ammoniak in $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure aufgefangen.

Nach Beendigung der Destillation wurde der Rückstand im Kolben mit Salzsäure gelöst, die Lösung auf ein kleines Volumen gebracht, in ein Becherglas übergeführt, mit Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt und der Niederschlag 24 Stunden sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wurde er aufs Filter gebracht und mit verdünnter salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, bis die Flüssigkeit nicht mehr gelbgefärbt ablief. Filter und Niederschlag überführte ich in einen Messcylinder, löste den Niederschlag mit der nöthigen Menge

starken Alkalien, die Lösung sammt dem vertheilten Papiere brachte ich auf ein bestimmtes Volumen und filtrirte ab. In einem aliquoten Theile des Filtrates wurde dann die Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl durchgeführt.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag sammt den Waschwässern wurde auf 500 ccm. gebracht und in davon entnommenen 100 ccm. nach Einengen auf ein kleines Volumen der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Die Zersetzung der phosphorwolframsäurehaltigen Flüssigkeiten gestaltet sich ziemlich schwierig. Es ist nöthig, um starkes Stossen zu vermeiden, auf 50 ccm. Flüssigkeit etwa 30 ccm. Kjeldahl-Säure zu nehmen und die Oxydation durch Permanganat zu befördern. Die Mischung wird abgekühlt, mit Permanganat versetzt und nun längere Zeit, etwa über Nacht, stehen gelassen, hierauf erst in gewöhnlicher Weise erhitzt. Um den bei Schwefelsäurezusatz entstehenden Niederschlag nicht überspülen zu müssen, nahm ich die Zersetzung in einem 1 Liter fassenden Destillationskolben aus Jenaer Glas vor. Eine vollständige Zersetzung ist erst nach andauerndem (öfters 10, selbst 20 Stunden währendem) Kochen zu erzielen. Als sicherstes Zeichen der erfolgten Zersetzung ist das reichliche Auftreten eines gelb gefärbten Niederschlages (Wolframtrioxyd) anzusehen. Die Anwesenheit grosser Mengen von Phosphorwolframsäure ist wegen der Nothwendigkeit, den Niederschlag mit einer diese Säure enthaltenden Lösung auszuwaschen, nicht zu vermeiden. Ich habe es vorgezogen, die daraus sich ergebende Unbequemlichkeit mit in Kauf zu nehmen, um nicht durch Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryt neue Fehlerquellen in das Verfahren einzuführen. Es ist selbstverständlich, dass eine Aufnahme von Ammoniak aus der Laboratoriumsluft seitens der sauren Flüssigkeiten zu vermeiden ist.

Das Verfahren dürfte in der angegebenen einfachen Gestalt zur raschen Orientirung über die Stickstoffbindung in den reinen Eiweisskörpern insofern sehr geeignet sein, als es bloss geringe Mengen Ausgangsmaterial erfordert. Da es öfter in Anwendung kommen dürfte, sei noch auf seine Fehlerquellen besonders aufmerksam gemacht.

Zunächst ist zu bemerken, dass die Zerkochung der Eiweisskörper mit concentrirter Salzsäure (ich habe nicht rauchende verwendet) ohne Zusatz von Zinnchlorür, eine dunkel gefärbte Zersetzungsflüssigkeit liefert, die ein stickstoffhaltiges, aber von mir nicht weiter berücksichtigtes Spaltungsprodukt, Schmiedeberg's Melanoidinsäure, enthält.¹⁾

¹⁾ Archiv f. exper. Path. u. Pharmacol., Bd. XXXIX, S. 1.

Diese Substanz verbleibt später im Phosphorwolframsäureniederschlag und vermehrt demgemäss die Menge des Diaminstickstoffs. Nach Schmiedeberg beträgt ihre Menge höchstens 1—2 % des angewandten Eiweisses, und da sie einen Stickstoffgehalt von 5—8 % besitzt, so ergibt dies, in Stickstoffprocenten gerechnet, im ungünstigsten Falle ein fehlerhaftes Plus von 0,16 %. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Melanoidinsäure, wie Nencki bemerkt, der chromogenen Gruppe des Eiweisses entstammt und diese selbst bei Trypsinverdauung als durch Phosphorwolframsäure fällbares Produkt erhalten wird. In welcher Form die chromogene Gruppe bei der Säurespaltung, abgesehen von der Melanoidinsäure, auftritt, ist unbekannt, ebenso, ob sie nicht auch bei Vermeidung der Melanoidinsäurebildung, z. B. beim Kochen mit Salzsäure und viel Zinnchlorür, durch Phosphorwolframsäure fällbare Produkte liefert. Durch entsprechende vergleichende Versuche dürfte sich später Aufklärung über diesen Punkt gewinnen lassen. Bemerkt sei, dass Eialbumin und Casein am meisten, Leim am wenigsten Melanoidinsäure lieferten.

Eine weitere Fehlerquelle liegt im Auswaschen des Phosphorwolframsäureniederschlages. Dasselbe ist einerseits, angesichts des grossen Volumens, nur schwierig bis zur vollständigen Beseitigung der Mutterlauge durchzuführen, andererseits ist zu befürchten, dass bei fortgesetztem Waschen vom Niederschlag kleine Antheile in Lösung gehen. Ueberdies setzt die Nothwendigkeit, verdünnte Phosphorwolframsäure als Waschflüssigkeit zu benutzen, dem Auswaschen eine Grenze, wenigstens dann, wenn man der Kontrolle wegen auch den Stickstoff der Amidosäuren bestimmen will, da sich, wie erwähnt, wegen des grossen Phosphorwolframsäuregehaltes die Bestimmung des Monaminostickstoffs nach Kjeldahl kaum mehr ausführen lässt. Ich habe in Vergleichsversuchen, wo auf die Bestimmung des Stickstoffs im Filtrat verzichtet wurde, das Auswaschen endgiltig durchgeführt, habe aber in Bezug auf Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäureniederschlages keine Differenzen mit nach gewöhnlicher Form ausgeführten Versuchen erhalten.

Eine geringe Ungenauigkeit führt die Vernachlässigung

des Filtrervolumens bei Abmessung der alkalischen Lösung des Phosphorwolframsäureniederschlags mit sich.

Beträgt das Trockengewicht des Filters von der verwendeten Grösse 2 gr. und berechnet man auf Grund des specifischen Gewichtes der Cellulose sein Volumen zu etwa 1,3 ccm., so bedeutet die Vernachlässigung dieser Grösse gegenüber dem Gesamtvolumen von gewöhnlich 250 ccm. einen Fehler von etwa 0,5 % des gesammten Stickstoffgehalts des Niederschlags; also z. B. bei 3 % Diaminostickstoff = 0,015 %.

Eine weitere Ungenauigkeit ist darin gegeben, dass bei Bestimmung des Amino- und Diaminostickstoffes stets nur ein aliquoter Theil der Lösung zur Bestimmung genommen wurde, der Versuchsfehler somit eine betreffende Multiplication erfahren musste.

Viel grösser als die bisher angeführten Fehler sind diejenigen, die durch unvollkommene Zersetzung mit Kjeldahl-Schwefelsäure, angesichts der geringen Zersetzbarkeit der betreffenden Säuren selbst und des hindernden Einflusses grosser Mengen von beigemengter Phosphorwolframsäure, bedingt sein können. Ich habe mich vor diesem Fehler dadurch zu schützen gesucht, dass ich den Stickstoffgehalt aller einzelnen Fractionen bestimmte und die Summe mit dem Stickstoffgehalt der ursprünglichen reinen Substanz verglich. Beim Serumalbumin habe ich in dieser Richtung keine genügende Uebereinstimmung erzielen können, weshalb ich die gefundenen Werthe nicht mittheile, mit Ausnahme der Zahlen für den Amidstickstoff, welche solchen Versuchsfehlern überhaupt nicht unterliegen.

Im Hinblick auf diese Schwierigkeiten möchte ich trotz ausgeführter zahlreicher Kontrolversuche die nach dem angeführten Verfahren erhaltenen Werthe nicht als absolut genaue ansehen. Bei den Verschiedenheiten jedoch, welche sich in Bezug auf Vertheilung des Stickstoffs in den einzelnen Eiweisskörpern herausgestellt haben, sind die gefundenen Zahlen für deren Charakterisirung und Unterscheidung, sowie für die Beurtheilung der Beziehungen derselben zu anderen Eiweissstoffen vollkommen ausreichend.

In Betreff der untersuchten Eiweisspräparate sei bemerkt:

Krystallisirtes Eieralbumin wurde nach Hofmeister¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 165 und Bd. XXIV, S. 159.

dargestellt und aus Ammonsulfatlösung umkrystallisirt, bis sich keine amorphen Beimengungen mehr zeigten. Die reinen Krystalle wurden durch Stehenlassen mit einem Gemenge von zwei Theilen Alkohol und einem Theile Wasser bei einer Temperatur von 90° coagulirt. Durch die Alkoholcoagulation sollten die etwa durch Kochen mit Wasser veranlassenden hydrolytischen Veränderungen vermieden werden. Die coagulirten Krystalle wurden auf dem Seidenfilter mit Wasser so lange gewaschen, bis im Filtrate mit Nessler's Reagens kein Ammoniak mehr nachweisbar war.

Krystallisirtes Serumalbumin wurde nach Gürber¹⁾ aus Pferdeblut gewonnen und ebenso behandelt wie Eieralbumin.

Serumglobulin (aus Pferdeblut) wurde nach Reye²⁾ vom Fibrinogen getrennt. Versetzt man 2 Vol. Serum mit 5,2 Vol. Wasser und 2,8 Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung, so ist die Ausfällung des Fibrinogens beendet. Bei 2 Theilen Serum, 5,1 Wasser und 2,9 Ammonsulfatlösung beginnt Globulin zu fallen. Man thut gut, auf 2 Vol. Serum 5 Vol. Wasser und 3 Vol. Ammonsulfatlösung zu nehmen, da man auf diese Weise sicher alles Fibrinogen entfernt. Der abfiltrirten Lösung wird so viel Ammonsulfatlösung zugesetzt, bis eine nahezu halb gesättigte Lösung von Ammonsulfat resultirt. Dabei fällt Globulin vollständig aus. Es ist vortheilhaft, der Lösung einige Cubikcentimeter weniger Ammonsulfat zuzusetzen, als bis zur halben Sättigung, da sonst aus concentrirter Eiweisslösung leicht Serumalbumin auszufallen beginnt. Das erhaltene Serumglobulin wurde mehrfach in Wasser gelöst und mit Ammonsulfatlösung wieder gefällt, die Lösung hierauf in flachen Schalen stehen gelassen, bis sich durch freiwilliges Verdunsten derselben das Globulin in Globuliten abschied. Es wurde wie das Eieralbumin weiter behandelt.

Zur Untersuchung des Caseins verwendete ich ein nach Hammarsten dargestelltes sehr reines Präparat von Merck.

Leim untersuchte ich in der Form der reinsten Gelatine des Handels.

Die mit den einzelnen Eiweisskörpern ausgeführten Versuche lasse ich in tabellarischer Anordnung folgen. Die Zahlen beziehen sich auf bei 110° getrocknete Substanz.

Da die käufliche Gelatine nicht als eiweissfrei anzusehen ist, habe ich von einer Gesamtstickstoffbestimmung in derselben abgesehen. Die Summe der erhaltenen Stickstoffwerthe habe ich mit 18%, dem annähernden Stickstoffgehalt des Glutins, in Rechnung gestellt.

¹⁾ Sitzungsberichte der Würzburg. phys.-med. Gesellschaft 1894 u. 1895.

²⁾ W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Diss. Stassburg 1898.

A. Bestimmung des Amidstickstoffes.

Tabelle I.

	Gewicht der Probe	N des mit MgO ab- destillirten NH ₃	Amid-N	
			in %	Mittel
Krystallisirtes Eieralbumin	1,3143	0,0168	1,28	1,28
	1,2012	0,0155	1,29	
Krystallisirtes Serumalbumin	1,0080	0,0107	1,06	1,01
	1,5346	0,0146	0,95	
	1,5965	0,0161	1,01	
Serumglobulin	1,2145	0,0169	1,39	1,41
	0,9210	0,0132	1,43	
Casein	0,8370	0,0178	2,13	2,10
	0,8370	0,0172	2,07	
Leim		0,0169	0,29	0,29
		0,0170	0,29	

B. Bestimmung des Diaminostickstoffes.

Tabelle II.

	Gewicht der Probe	Volumen der Lösung des Phos- phorwol- f- r- säure- nieder- schlages	Volumen des zur Be- stimmung ver- wendeten Theiles	Gefunden N			
				direkt in gr.	in der ganzen Probe	%	Mittel %
Krystallisirtes Eieralbumin	1,2012	250	60	0,0098	0,0408	3,39	3,20
	1,2012	250	60	0,0087	0,0361	3,01	
Serumglobulin	0,9210	150	50	0,0122	0,0366	3,97	3,95
	0,9210	150	45	0,0109	0,0363	3,94	
Casein	0,8370	250	100	0,0059	0,0147	1,75	1,84
	0,8370	250	100	0,0054	0,0135	1,61	
	1,6695	250	50	0,0051	0,0255	1,52	
	1,6695	250	50	0,0078	0,0390	2,33	
	2,3040	248	50	0,0093	0,0461	2,00	
Leim		250	10	0,0146	0,3650	6,28	6,45
		250	10	0,0155	0,3875	6,62	

C. Bestimmung des Monaminostickstoffs.

Tabelle III.

	Gewicht der Probe	Volumen des Phosphorwol- framsäure- filtrates ccm.	Volumen des zur Be- stimmung ver- wendeten Theiles ccm.	Gefunden			
				direkt	in der ganzen Probe	%	Mittel %
Krystallisirtes Eieralbumin	1,3143	500	120	0,0308	0,1283	9,76	10,17
	1,3143	500	60	0,0167	0,1392	10,59	
Serumglobulin	1,2145	350	100	0,0393	0,1375	11,32	10,81
	0,9210	500	90	0,0178	0,0988	10,72	
	1,2145	350	100	0,0361	0,1263	10,40	
Casein	0,8370	500	100	0,0202	0,1010	12,06	11,93
	0,8370	500	100	0,0198	0,0990	11,81	
Leim		500	25	0,0332	0,6640	11,39	11,26
		500	25	0,0324	0,6480	11,12	

In nachstehender Tabelle sind des besseren Vergleiches halber die procentischen Mittelwerthe zusammengestellt. In der 5. Columnne ist die Summe der gefundenen Stickstoffwerthe angeführt, in der 6. Columnne der Stickstoffgehalt der betreffenden Stoffe auf Grund der Analyse des angeführten Autors.

Tabelle IV.

	Amid- stick- stoff	Di- amino- stick- stoff	Mon- amino- stick- stoff	Summe	Stickstoffgehalt	
						nach
Krystallisirtes Eieralbumin	1,28	3,20	10,17	14,65	15,00	Hofmeister
Serumglobulin	1,41	3,95	10,81	16,17	15,83	Hammarsten
Casein	2,10	1,84	11,93	15,87	15,7	Hammarsten
Leim	0,29	6,45	11,26	18,00	—	—

Berechnet man aus diesen Zahlen, wieviel Procent des Gesamtstickstoffes in Form von Amid-, Diamino- und Mon-

aminostickstoff enthalten sind, unter Zugrundelegung der von den angeführten Autoren angegebenen Stickstoffwerthe, so ergibt sich:

Tabelle V.

	Amidstickstoff %	Diamino- stickstoff %	Monamino- stickstoff %	Stickstoff in Summe gefunden statt 100 %
Krystallisirtes Eieralbumin	8,53	21,33	67,80	97,66 %
Krystallisirtes Serumalbumin	6,34	—	—	—
Serumglobulin	8,90	24,95	68,28	102,13 %
Casein	13,37	11,71	75,98	101,06 %
Leim	1,61	35,83	62,56	—

Die Zahlen der letzten Columnne zeigen, inwieweit die Summe der für die Eiweisskörper gefundenen Stickstoffwerthe dem thatsächlichen Stickstoffgehalte entspricht. Die Differenzen, die sich da gegen 100% ergeben, können in Hinblick auf die Zahl der Summanden nicht als erheblich angesehen werden.

In Betreff der ermittelten Zahlen ist noch Einiges zu bemerken. Was den Amidstickstoff anbelangt, dessen Bestimmung sich, wie erwähnt, mit grosser Schärfe durchführen lässt, ergibt sich eine erfreuliche Uebereinstimmung mit den Zahlen, welche andere Autoren unter ähnlichen Verhältnissen an Eiweisskörpern erhalten haben. Namentlich sind die Zahlen aus Nasse's zweiter Abhandlung in dieser Richtung von Interesse, wobei jedoch zu beachten ist, dass er keineswegs mit reinen Eiweisskörpern gearbeitet hat. Ich stelle nachstehend die von mir gefundenen Werthe mit den von Nasse ermittelten und von mir in entsprechender Weise umgerechneten Zahlen neben einander.

N a s s e		H a u s m a n n	
Coagulirtes, käufliches Eieralbumin	1,46	Krystallisirtes Eieralbumin	1,28
Serumeiweiss (globulinhaltig)	1,18	Krystallisirtes Serumalbumin	1,01
Casein I	1,76	Casein nach Hammarsten	2,10
Leim	0,45	Leim	0,29

Wie man sieht, entfernen sich die Zahlen Nasse's kaum weiter von den meinen, als durch die ungleiche Reinheit der verwendeten Präparate erklärt werden kann. Ueberhaupt kann man nach meinen Erfahrungen die Menge des Amidstickstoffes als eine scharf bestimmbare und für die einzelnen reinen Eiweisskörper sehr charakteristische Grösse bezeichnen. Sie liegt für die untersuchten ächten Eiweisskörper zwischen 1—2%, und damit stimmt auch, dass nach Erfahrungen über die Einwirkung von Natronlauge (Blum und Vaubel)¹⁾ aus Eieralbumin etwa 1—2% des gesammten Stickstoffes in Form von Ammoniak abgespalten werden kann, ferner dass H. Schiff²⁾ den Stickstoffgehalt von Eieralbumin nach Einwirkung von salpetriger Säure um etwas mehr als 1% vermindert fand. Danach ist zu vermuthen, dass der durch Säure abspaltbare Stickstoff auch der Abspaltung durch Natronlauge und salpetriger Säure unterliegt. Das Verhalten stimmt vorläufig am besten mit der schon von O. Nasse ausgesprochenen Vermuthung, dass der leicht abspaltbare Stickstoff im Eiweissmolekül ursprünglich in-CONH₂-Gruppen vorhanden sei.

Da der Diaminostickstoff, wie oben erwähnt, bis auf den etwa der chromogenen Gruppe angehörigen Antheil in Form von Arginin, Lysin und Histidin vorhanden sein dürfte, so ge-

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie, Bd. LVII, S. 378.

²⁾ Chem. Berichte, Bd. XXIX, S. 1354.

statten die gefundenen Werthe annähernd eine Beurtheilung, in welchen Quantitäten die genannten Diaminosäuren im Eiweiss enthalten sein können. Unter der Annahme, dass der gesammte Diaminostickstoff in Form von Arginin vorhanden wäre, würde sich für die untersuchten Substanzen folgender Gehalt daran ergeben:

Krystallisirtes Eialbumin: 9,92%, Serumglobulin: 12,24%, Casein: 5,70%, Leim: 20,05%.

Da aber diese Eiweisskörper neben Arginin vermuthlich noch die stickstoffärmeren Diaminverbindungen enthalten, so dürften die angeführten Zahlen entsprechend zu niedrig sein.

Da die Bestimmung des Gehaltes der Eiweissstoffe an den einzelnen Diaminosäuren von anderer Seite in Angriff genommen ist, so konnte ich auf weitere Untersuchungen in dieser Richtung verzichten.

Zum Schlusse sei auf einige physiologische Schlussfolgerungen hingewiesen.

Bei Betrachtung der Tabelle V sieht man, dass das Globulin in der Vertheilung des Stickstoffes sich vom Eialbumin entfernt, noch mehr aber das Casein; der Leim fällt vollends aus der Reihe. Man kann hieraus entnehmen, welche zum Theil tiefgreifenden Veränderungen öfter erfolgen müssten, wenn Eiweissstoffe, die man als einander nahestehend auffasst, in einander übergehen sollen. So ist z. B. die Annahme, dass Serumglobulin unter Anlagerung einer Nucleingruppe in Casein übergehen sollte, schlechtweg auszuschliessen. Ebenso muss bei Bildung der Collagens aus Eiweiss geradezu eine Umwälzung im Molekül stattfinden. Der allgemeine Brauch, bei Beurtheilung von Stoffwechselvorgängen Eiweissarten verschiedener Herkunft einfach gleich zu setzen, ist sonach, streng genommen, unrichtig. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die von mir untersuchten Eiweisskörper keineswegs die äussersten Fälle in Bezug auf Verschiedenheit der Eiweissstoffe darstellen. Die Weite, innerhalb deren sich die Verschiedenheiten bewegen können, lässt sich bis jetzt am besten beurtheilen bei Nebeneinanderstellen der von mir für Amid- und Diaminostickstoff des Caseins und des krystallisirten Eialbumins gefundenen

Werthe mit den von E. Schulze für einen Eiweisskörper der Coniferensamen gefundenen Zahlen.

	Amidstickstoff	Diamino- stickstoff
Eiweisskörper der Coniferensamen	10,3	32,8
Krystallisirtes Eieralbumin	8,53	21,33
Casein	13,37	11,71

Es ist wohl als ausgeschlossen anzusehen, dass Protein-
stoffe von so grosser Verschiedenheit der Stickstoffbindung sich
physiologisch in jeder Beziehung ersetzen können. Da neben der
Monamino- und Diaminosäuren auch die anderen Complexe des
Eiweissmoleküls, die Kohlehydrat-, aromatische und chromogen
Gruppe, für den Organismus, und zwar in ganz verschiedene
Richtung Bedeutung besitzen, so ist ersichtlich, dass eine je-
weilige quantitative Aufklärung des Aufbaues der Proteinstoffe
unsere Vorstellungen über Werth und Rolle derselben als Nähr-
und Baumaterial des Organismus in einschneidender Weise
beeinflussen muss.

Ueber Molekularverhältnisse von Tetanustoxinlösungen.

I. Mittheilung.

Von

Dr. W. G. Ruppel und Dr. F. Ransom.

Aus dem Privatinstitut des Professors Dr. Behring für experimentelle Therapie.

(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1899.)

Nach den thermodynamischen Betrachtungen van t'Hoff's¹⁾ ist man berechtigt, in isotonischen Lösungen, d. h. in Lösungen von gleichem osmotischen Druck, eine gleiche Anzahl von Molekülen anzunehmen. Lösungen, welche den gleichen Gefrierpunkt zeigen, enthalten danach gleich viele Moleküle, und umgekehrt besitzen äquimolekulare Lösungen den gleichen Gefrierpunkt. Aus der beobachteten Gefrierpunktserniedrigung einer Lösung lässt sich daher die Zahl der vorhandenen Moleküle berechnen. Der Gefrierpunkt einer Lösung sinkt proportional der Zunahme der Concentration. Die Gefrierpunktsdifferenz zwischen Lösungsmittel und Lösung wächst proportional der Anzahl der gelösten Moleküle, gleichviel welcher Art dieselben sind.

Auf diese grundlegenden Gesetze van t'Hoff's stützt sich die von Raoult²⁾ zur Bestimmung der Molekulargewichte von organischen Verbindungen angewandte Gefrierpunktsernie-

1) J. H. van t'Hoff, Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. I, S. 481, 1887.

2) F. M. Raoult, Ann. de Chim. et de Phys., 20, p. 217, 1880, 28, p. 133, 1883. 29^{II}, p. 66, 93, 99 u. 115, 1884. 30^{IV}, p. 401, 1885 u. a. O.

drigungsmethode, welche mit Hülfe des von Beckmann¹⁾ construirten Apparates leicht ausführbar ist.

Nach Raoult-Beckmann's Methode ist es gelungen, die Molekulargrösse vieler organischer Verbindungen zu ermitteln. Wir haben nun versucht, dieses Verfahren auch zur Erforschung der molekularen Verhältnisse in Lösungen von Toxinen und Antitoxinen zu verwenden. Bei diesen Versuchen musste man von vornherein auf die Aussicht verzichten, zu absolut richtigen Zahlengrössen zu gelangen, da wir keine reinen Toxine und Antitoxine besitzen. Wir mussten uns in Folge dessen zunächst darauf beschränken, Lösungen von Toxinen und Antitoxinen, deren Gehalt an wirksamer Substanz durch das Thierexperiment festgestellt werden konnte, hinsichtlich ihrer Gefrierpunkte miteinander zu vergleichen und ferner die Veränderungen zu verfolgen, welche durch das Wachsthum der Bakterien und die hiermit eventuell verbundene Giftbildung in den Nährsubstraten oder durch das Auftreten der Antikörper im Blut immunisirter Thiere hervorgerufen werden.

Zahlreiche Versuche mit Tetanusbouillonculturen haben zu folgenden Ergebnissen geführt: Es gelingt thatsächlich, mit Hülfe der Raoult-Beckmann'schen Methode Unterschiede in der Zusammensetzung von Nährflüssigkeiten vor und nach dem Wachsthum von Tetanusbacillen zu constatiren; und zwar deuten die nach dem Wachsthum stets beobachteten Erniedrigungen des Gefrierpunktes auf eine Vermehrung der Moleküle in den betreffenden Flüssigkeiten. Hierdurch könnte die Annahme als berechtigt erscheinen, dass bei der Lebensthätigkeit der Tetanusbacillen spaltende Processe gegenüber der synthetischen vorherrschen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Eine aus Fleischpresssaft und käuflichem Pepton hergestellte Nährbouillon wurde in zwei Portionen getheilt. Die eine Portion wurde mit Tetanusbacillen geimpft, während die andere nur zur Kontrolle diente und deshalb in dieser Abhandlung als Controllbouillon be-

¹⁾ E. Beckmann, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. II, S. 638, 1888. Bd. VII, S. 324, 1891.

zeichnet werden soll. Beide Portionen wurden sodann in eine Wasserstoffatmosphäre gebracht, und verblieben bis zur Prüfung im Brutschrank bei 37° C.

Unsere Beobachtungen werden am besten aus folgender Tabelle ersichtlich.

Tabelle I.

Datum	Trockengehalt der		Gefrierpunkt von			Differenz gegen		Giftwerth 1 ccm. =
	Kontroll- Bouillon	Tetanus- Bouillon	Wasser	Kontroll- Bouillon	Tetanus- Bouillon	Gefrier- Wasser	Gefrier- Bouillon	
17. XII. 98	2,95 ‰	—	2,590°	2,170°	—	0,420°	—	—
17. I. 99	2,95 ‰	2,95 ‰	5,165°	4,755°	4,550°	0,615°	0,200°	400000 + Ms.
23. I. 99	4,47 ‰	—	4,770°	4,110°	—	0,660°	—	—
31. I. 99	4,47 ‰	4,42 ‰	4,770°	4,110°	3,910°	0,860°	0,200°	500000 + Ms.
30. I. 99	4,35 ‰	—	4,115°	3,375°	—	0,740°	—	—
3. II. 99	4,35 ‰	4,35 ‰	4,115°	3,375°	3,240°	0,875°	0,130°	2000000 + Ms.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass das Aufbewahren der Kontrollbouillon unter den gleichen Bedingungen, unter welchen das Wachsthum der Tetanusbacillen erfolgt, weder eine Veränderung am Trockengehalt, noch am Gefrierpunkt hervorruft. Nach dreitägigem Wachsthum der Bacillen zeigte der Gefrierpunkt nur eine geringe Differenz gegenüber der Kontrollbouillon, während er nach sieben Tagen seine tiefste Lage erreicht hat. Eine weniger concentrirte Bouillon zeigte nach vierwöchentlichem Verbleiben im Brutschrank dieselbe Erniedrigung wie nach 7 Tagen.

Aus obigen Versuchen geht ein Zusammenhang zwischen der Gefrierpunktserniedrigung und dem Giftwerth nicht direkt hervor, indem bei der geringsten Differenz (0,130°) der Giftwerth am höchsten, dagegen bei der grösseren Differenz (0,200°) nach vierwöchentlichem Wachsthum der Bacillen am geringsten war.

Die Beobachtung, dass der direkte Giftwerth einer Tetanusbouillon abnehmen kann, während die Cultur sich im Brutschrank unter Luftabschluss befindet, ist bekannt. Dass die Abschwächung des direkten Giftwerthes weit rascher erfolgt, wenn

die Bouillon der atmosphärischen Luft ausgesetzt wird, lässt sich experimentell mit Leichtigkeit nachweisen.

Eine Bouillon, welche nach dreitägigem Wachsthum der Tetanusbacillen einen Giftgehalt von 2000 000 + Ms. in 1 ccm. hatte (d. h. 1 ccm. enthielt eine Giftmenge, welche genügte, um 2000 000 gr. Lebendmäusegewicht oder 100 000 Mäuse von je 20 gr. Gewicht zu tödten), zeigte nach dreitägigem Stehen an der Luft nur noch einen Giftwerth von 500 000 + Ms. in 1 ccm.

Es ist bemerkenswerth, dass mit dieser Abschwächung auch eine Aenderung des Gefrierpunktes der Tetanusbouillon Hand in Hand ging, und zwar erfuhr der Gefrierpunkt der Bouillon nach dreitägigem Stehen nicht eine Erniedrigung, sondern im Gegentheil eine immerhin bemerkbare Erhöhung. Obige Bouillon zeigte am 3. II. 99 einen Gefrierpunkt bei 3,240°, während der Gefrierpunkt der abgeschwächten Bouillon am 6. II. 99 bei 3,260° lag.

Bei völliger Zerstörung des Tetanusgiftes, wie eine solche durch Erhitzen der Tetanusbouillon auf 100° C. oder darüber erfolgt, wird diese Steigerung der Gefriertemperatur noch mehr in die Augen fallend.

Diese Verhältnisse gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle II.

Datum	Giftwerth 1 ccm. =	Gefrierpunct der		Differenz gegen		Erhitzt auf
		des Wassers	Tetanus- Bouillon	Gefrier- Wasser	Gefrier- Bouillon	
3. II. 99	2000000 + Ms.	4,115°	3,240°	0,875°	—	
6. II. 99	500000 + Ms.	4,155°	3,260°	0,855°	0,02°	
6. II. 99	500000 + Ms.	4,115°	3,260°	0,855°	—	
6. II. 99	0	4,115°	3,305°	0,720°	0,135°	100° ¹ / ₂ Stunde
6. II. 99	0	4,115°	3,645°	0,470°	0,385°	150° i. v. 10 Min.

Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass bei der Abschwächung des Tetanusgiftes in der Bouillon eine Zusammenlagerung von Molekülen (Condensation) stattfindet.

Auch die Veränderungen, welche das Auftreten der Antikörper im Blute immunisirter Thiere hervorruft, haben wir versucht, mit Hülfe dieser Methode zu verfolgen, ebenso wie wir bemüht waren, die Wechselwirkung zwischen Toxin und Antitoxin durch Veränderungen des Gefrierpunktes der betreffenden Lösungen festzustellen, jedoch sind unsere Versuche noch nicht weit genug gediehen, um jetzt schon definitive Resultate zu geben. Wir behalten uns vor, dieselben in einer späteren Mittheilung zu veröffentlichen.

Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls.

Von
Fr. Pröschner.

(Aus dem Laboratorium von Prof. v. Bunge in Basel.)
(Der Redaction zugegangen am 16. Februar 1899.)

Bei den bisherigen Untersuchungen über die Constitution des Eiweissmoleküls sind zwei Punkte vernachlässigt worden: Erstens ist man nicht von reinem, krystallisirtem Eiweiss ausgegangen und zweitens hat man eine möglichst genaue quantitative Bestimmung der bis jetzt bekannten Spaltungsprodukte unterlassen.

Auf Anregung von Prof. v. Bunge habe ich es nun versucht, das Eiweissmolekül abzubauen, unter Berücksichtigung der oben erwähnten Punkte.

Als Ausgangsmaterial zur Untersuchung wurde krystallisiertes Hämoglobin verwendet. Dasselbe wurde nach der Methode von Zinoffsky¹⁾ dargestellt und doppelt umkrystallisirt. Ich versuchte zuerst das Eiweiss des Hämoglobins vom Hämatin zu trennen. Das Ausziehen des Hämatins mit alkoholischem Ammoniak ist äusserst umständlich und erfordert für kleine Mengen Hämoglobin viel Alkohol. Ich wandte folgende Methode an, um das Eiweiss des Hämoglobins vom Hämatin zu trennen: Das noch feuchte Hämoglobin wird eine Zeit an der Luft stehen gelassen, oder es wird ein Luftstrom durchgeleitet, um den Alkohol zu entfernen. Darauf wird das Hämoglobin mit 10 bis

¹⁾ O. Zinoffsky, «Ueber die Grösse des Hämoglobinmoleküls». Zeitschr. f. physiolog. Chemie 1886, Bd. X, S. 16—34.

12%iger Salzsäure digerirt und auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 45—50° das Eiweiss extrahirt. Das Hämatin bleibt ungelöst am Boden des Gefässes; man decantirt die Flüssigkeit ab und neutralisirt mit Natronlauge und kocht; das Eiweiss fällt in grau-weissen Flocken aus. Man extrahirt nun das zurückgebliebene Hämatin so lange mit Salzsäure, bis bei der Neutralisation keine Trübung mehr entsteht. Diese Methode ist zur Gewinnung kleiner Mengen Eiweiss verwendbar, aber, um grössere Quantitäten darzustellen, zu zeitraubend. Ich habe deshalb diese Methode wieder verlassen und das Häoglobin direkt mit Zinnchlorür und Salzsäure zerlegt. Das Häoglobin wurde nicht frisch verarbeitet, sondern erst getrocknet, dann möglichst fein pulverisirt und in die kochende Lösung von Zinnchlorür und Salzsäure allmählich eingetragen. Zum Erhitzen wurde eine Glasretorte angewandt, die mit einem Rückflusskühler versehen wurde. Zur Verwendung kamen 240 gr. doppelt umkrystallisirtes, bei 120° getrocknetes Häoglobin, das in 1100 ccm. einer ca. 20%igen Salzsäure, welcher 50 gr. Zinnchlorür zugesetzt waren, 76 Stunden lang am Rückflusskühler erhitzt wurde. Das dunkelrothbraune Reactionsprodukt wurde nun auf ca. 5 Liter verdünnt und das Zinn mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Das Filtrat war schwach weingelb gefärbt. Das Hämatin bleibt fast ganz ungelöst und findet sich als feinkörniges Pulver am Boden des Gefässes. Die geringe Menge, welche mit in Lösung geht, wird durch das Schwefelzinn mit niedergerissen, so dass die Lösung nach dem Filtriren fast völlig farblos ist. Sodann wurde das Filtrat auf dem Wasserbade etwas eingeengt und darauf mit 1500 gr. krystallisirter Phosphorwolframsäure¹⁾ versetzt, die in wenig Wasser gelöst war, wobei der Anfangs entstehende Niederschlag sich löste und erst bei weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure abschied. Das Ganze wurde erkalten gelassen, wobei die halbflüssige Masse zu einem theils körnigen, theils krystallinischen

¹⁾ M. Siegfried, Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. Ber. der d. chem. Gesellschaft, Bd. 24, S. 418—432. — E. Fischer. «Ueber Spaltungsprodukte des Leucins. Inaug.-Dissert. 1890.

Brei erstarrte. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit 5 %iger Schwefelsäure, welche mit Phosphorwolframsäure versetzt war, chlorfrei gewaschen. Der chlorfreie Niederschlag wurde dann in heissem Wasser suspendirt, wobei ein Theil sich löste. Die kochende Lösung wurde mit einem geringen Ueberschuss von Baryhydrat versetzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten wurde filtrirt, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt, 15 Minuten zur Abscheidung des kohlensauren Baryums erwärmt und filtrirt. Das Filtrat wurde mit einer Lösung von 40 gr. salpetersauren Silbers versetzt. Sogleich fiel ein amorpher, gelbweisser Niederschlag aus, der nach 24 Stunden abfiltrirt, salpetersäurefrei gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Die Menge des Niederschlags betrug 15,7275 gr. = 6,533% der ursprünglichen Hämoglobinmenge.

Die Analyse ergab folgende Werthe:

0,1760 gr. Subst. gaben: 0,0335 H₂O

und 0,1230 CO₂.

0,1595 gr. Subst. gaben: 16,5 ccm. N bei 22° u. 738,8 mm. Hg.

0,1640 gr. Subst. gaben: 0,0932 Ag.

19,03% C

2,21% H

11,35% N

10,59% O

56,82% Ag.

Das Filtrat von diesem Niederschlag war schwach trüb und wurde auf dem Wasserbade zum dünnen Syrup eingedampft, wobei sich ein Theil des Silbers als schwarzer, schmieriger Niederschlag abschied. Derselbe wurde abfiltrirt und das weingelbe Filtrat allmählich mit Alkohol versetzt. Nach einiger Zeit entstand ein schwach gelbweisser, amorpher Niederschlag, der sich nach mehrstündigem Stehen nicht vermehrt hatte. Es wurde nun Aether zugegeben und einige Tage stehen gelassen. Der Niederschlag hatte sich noch etwas vermehrt. Derselbe wurde abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Menge des Niederschlags betrug 1,9087 gr. = 0,795%.

0,1759 gr. Subst. gaben: 0,0380 gr. H_2O
und 0,1265 > CO_2
0,2215 gr. Subst. gaben: 38,5 ccm. N bei 22° u. 738,8 mm. Hg.
0,0382 gr. Subst. gaben: 0,0197 Ag.
19,55 % C
2,40 % H
19,097% N
7,383% O
51,57 % Ag.

Das Filtrat von diesem Niederschlag gab auf weiteren Zusatz von Aether keinen Niederschlag mehr. Es wurde nun der grösste Theil des Aethers und Alkohols auf dem Wasserbade abdestillirt, der Destillationsrückstand erkalten gelassen, filtrirt und nochmals mit Aether und Alkohol versetzt. Sofort fiel ein weissgelber amorpher Niederschlag aus, welcher nach vier- undzwanzigstündigem Stehen abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und getrocknet wurde.

Die Menge des Niederschlags betrug 2,1480 gr. = 0,895%.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0,1590 gr. Subst. gaben: 0,0310 gr. H_2O
und 0,1240 gr. CO_2 .
0,2655 gr. Subst. gaben: 36 ccm. N bei 22° u. 738,8 mm. Hg.
0,1640 gr. Subst. gaben: 0,0932 gr. Ag.
21,25 % C
2,14 % H
14,887% N
12,873% O
48,85 % Ag.

Das Filtrat von letzterem Niederschlag wurde nochmals der Destillation unterworfen und gab auf abermaligen Zusatz von Aether nur noch eine geringe Menge Niederschlag. Eine genauere Untersuchung der einzelnen Silbersalze werde ich noch ausführen. Die vorliegenden Mengen waren zu gering, um eingehendere Studien damit anzustellen. Der Alkohol und Aether wurde nun auf dem Wasserbade völlig verjagt, der zurückbleibende Syrup mit Wasser verdünnt und mit Schwefelwasserstoff behandelt, um den Rest des Silbers auszufällen. Nachdem die Flüssigkeit durch Erwärmen vom Schwefelwasserstoff befreit war, wurde dieselbe zum dicken Syrup eingedampft,

mit absolutem Alkohol behandelt, wobei sie sich fast völlig löste. Die Lösung wurde nun mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung¹⁾ versetzt. Es entstand nach einiger Zeit ein weisser, flockiger Niederschlag, der einige Tage stehen blieb, dann filtrirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Schwefelquecksilber wurde abfiltrirt und das Filtrat zur Trockene verdampft. Es hinterblieben 0,5680 gr. eines in weissen Blättchen krystallisirenden Körpers, welcher auf Cholin und Betain geprüft wurde, aber keine sichere Reaction auf dieselben gab.

Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Die überschüssige Phosphorwolframsäure wurde mit Barythydrat entfernt, das Filtrat mit Schwefelsäure versetzt, um den überschüssigen Baryt auszufällen, und mit kohlensaurem Blei behandelt, um den grössten Theil der Salzsäure zu entfernen. Das Bleichlorid wurde abfiltrirt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und der Rest der Salzsäure mit Silberoxyd entfernt. Die salzsäurefreie Lösung wurde auf dem Wasserbade zum dicken Syrup eingedampft und einige Tage in der Kälte stehen gelassen, um das Tyrosin zur Abscheidung zu bringen. Der zu einem Brei erstarrte Syrup wurde nun in wenig Wasser gelöst, wobei das Tyrosin zurückblieb. Dasselbe wurde abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. Die Menge desselben betrug 3,639 gr. = 1,52%, umkrystallisirt aus verdünntem Ammoniak 1,7728 = 0,738%. Die Stickstoffbestimmung nach Warrentrapp-Will ergab aus 0,0772 gr. Substanz 0,095 $\text{PtCl}_6(\text{NH}_4)_2$ = 7,64% N. N aus der Formel des Tyrosins berechnet = 7,73%.

Zur Trennung von Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylamidopropionsäure wurde folgendes Verfahren angewandt. Das Filtrat vom Tyrosin wurde auf ca. 2 Liter verdünnt und mit einer gesättigten Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Das salpetersaure Quecksilberoxyd

¹⁾ J. E. Schulze, «Ueber basische Stickstoffverbindungen aus dem Samen von *Vicia sativa* und *Pisum sativ.* Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XV, S. 140—161, 1891 u. Bd. XVII, S. 193—216, 1893.

fällt die Asparaginsäure, Glutaminsäure und einen Theil der Phenylamidopropionsäure¹⁾ aus, während das Leucin in Lösung bleibt. Der Niederschlag wird gut ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat eingeeengt und mit einer ammoniakalischen Silberlösung versetzt. Der entstehende Niederschlag besteht, wie Siegfried²⁾ gezeigt hat, aus asparaginsaurem Silber. Die auf diese Weise gewonnene Asparaginsäure betrug 0,4697 gr. = 0,1950%. Eine Stickstoffbestimmung war mir leider nicht möglich zu machen, da mir ein Theil der Substanz beim Umkrystallisiren verloren ging. Aus dem Filtrat der Asparaginsäure wurde das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt und die Salpetersäure mit Bleioxydhydrat. Nach Entfernung des Bleies mit Schwefelwasserstoff wurde die Lösung mit Salzsäure versetzt und zwei Monate im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit hatte sich eine geringe Menge salzsaurer Glutaminsäure ausgeschieden, die abfiltrirt, mit Silberoxyd zur Entfernung der Salzsäure behandelt, eingedampft und getrocknet wurde. Ihre Menge betrug 0,0265 gr. = 0,011% Glutaminsäure. Eine Stickstoffbestimmung auszuführen, war bei der geringen Menge nicht möglich. Das Filtrat der salzsauren Glutaminsäure wurde, nach Abscheidung der Salzsäure mit Silberoxyd, zur Prüfung auf Phenylamidopropionsäure verwandt. Da bis jetzt die Phenylamidopropionsäure nur in geringer Menge gefunden worden und die Reingewinnung mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist, sah ich von einer quantitativen Bestimmung ab. Es wurde der Rückstand mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure am Rückflusskühler erhitzt. Nach wenigen Minuten trat der deutliche Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach halbstündigem Kochen wurde die Flüssigkeit erkalten gelassen. Dieselbe hatte deutlichen Geruch nach Benzoesäure. Eine Ausscheidung der Benzoesäure fand wegen der geringen Menge nicht statt. Auch Ausschütteln mit Benzol ergab einen

1) E. Schulze, Ueber die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweissstoffe mit Salzsäure und Barytwasser entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 63—121.

2) M. Siegfried, Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. Berichte der d. chem. Gesellsch. Bd. 24, 418—432.

minimalen Rückstand, der keine deutliche Reaction auf Benzoesäure zeigte.

Filtrat vom Quecksilberniederschlag.

In die vom ersten Quecksilberniederschlag abgelaufene Flüssigkeit wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet zur Entfernung des Quecksilbers. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde mit Bleioxydhydrat behandelt, um die Salpetersäure zu entfernen, und eingedampft. Die Flüssigkeit erstarrte zu einem krystallinischen Brei, der der Hauptmenge nach aus Leucin bestand. Die ganze Masse wurde auf das Saugfilter gebracht, abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde nochmals mit salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Es entstand noch ein geringer Niederschlag, welcher abfiltrirt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Das Filtrat von Schwefelquecksilber gab mit ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag mehr; auch bei längerem Stehen im Eisschrank schieden sich keine Krystalle ab. Ich dampfte die Flüssigkeit ein und oxydirte den geringen Rückstand mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure. Sogleich nach dem Erwärmen trat der deutliche Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach halbstündigem Erhitzen wurde die Flüssigkeit erkalten gelassen, wobei sich eine geringe Menge Benzoesäure in feinen Blättchen ausschied. Die Flüssigkeit wurde dann mit Aether ausgeschüttelt und der Aether verdunstet. Der Rückstand hatte stechenden Geruch nach Benzoesäure und gab mit Eisenchlorid den bekannten rostbraunen Niederschlag. Eine Schmelzpunktbestimmung war wegen der geringen Menge nicht möglich, da beim Umkrystallisiren zu viel verloren gegangen wäre und auch geringe Verunreinigungen den Schmelzpunkt bedeutend herabdrücken. Die vom zweiten Quecksilberniederschlag abgelaufene Flüssigkeit musste den Rest des Leucins enthalten und wurde wie oben behandelt. Diese Leucinmenge wurde mit der früher gewonnenen zusammen aus alkoholischem Ammoniak umkrystallisirt; die Summe beider Mengen betrug 100,077 gr. = 41,7% Leucin. Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Werthe:

0,1380 gr. Subst. gaben 0,2300 gr. $\text{PtCl}_6(\text{NH}_4)_2 = 10,43\%$ N.
Die Formel des Leucins fordert $10,7\%$ N.

Hlasiwetz und Habermann fanden bei der Zersetzung des Eiweisses mit Zinnchlorür und Salzsäure Chlorammon in dem erhaltenen Reactionsprodukt. Sie nahmen an, dass dasselbe von jenen im Eiweiss primär enthaltenen Verbindungen abstamme, welche gleichzeitig Asparaginsäure und Glutaminsäure liefern. Es ist wahrscheinlich der Stickstoff einer NH_2 -Gruppe, welcher in Form von Ammoniak abgespalten wird.

Bei meinen Versuchen wurden zur Bestimmung des Ammoniaks 20 gr. Hämoglobin mit Zinnchlorür und Salzsäure zersetzt und nach Ausfällung des Zinns auf 200 ccm verdünnt. 5 ccm der Lösung wurden mit Kalilauge versetzt, destillirt und das Ammoniak in Salzsäure aufgefangen.

I. 5 ccm der Lösung gaben 0,1810 $\text{PtCl}_6(\text{NH}_4)_2 = 2,26\%$ N. d. Hämoglobins.

II. 5 „ „ „ 0,1837 „ = $2,30\%$ „ „ „

Im Mittel: $2,28\%$.

In folgender Tabelle sind die aus den gefundenen Mengen der Spaltungsprodukte berechneten Procente C, H etc. zusammengestellt:

	Leucin	Tyrosin	Glutamin- säure	Asparagin- säure	Silbersalze:		
					I.	II.	III.
C	22,918	0,912	0,0049	0,0703	1,243	0,155	0,190
H	4,1388	0,0845	0,00067	0,0102	0,144	0,019	0,019
N	4,4566	0,118	0,00104	0,0205	0,741	0,151	0,133
O	10,186	0,4053	0,0047	0,0938	0,689	0,058	0,155

Summe:

C = 25,4725

H = 4,41617

N = 7,90114

O = 11,5518.

Procentische Zusammensetzung des Hämoglobins, für C, H, N, S. Mittel aus 4 Analysen,¹⁾ für Sauerstoff aus 3 Analysen:

¹⁾ Hoppe-Seyler und Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIV, S. 289.

Otto, ebendas. Bd. VII, S. 61.

Bücheler, Hüfner, Gratulationsschrift an Ludwig 1886.

Zinoffsky, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, S. 16.

54,72 C
6,99 H
17,52 N
0,59 S
19,73 O
0,42 Fe.

Eine Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung vom Hämoglobin habe ich selbst ausgeführt und folgende Werthe erhalten:

0,2794 gr. Subst. gaben 0,5620 CO₂ und 0,1720 H₂O =
54,86% C u. 6,83% H.

Vergleichen wir nun die gefundenen Werthe mit der procentischen Zusammensetzung des Hämoglobins, so ergibt sich, dass wir beinahe die Hälfte Kohlenstoff, circa die Hälfte Stickstoff, $\frac{2}{3}$ Wasserstoff und etwas mehr als die Hälfte Sauerstoff in den Spaltungsprodukten wiedergefunden haben. Die andere Hälfte der Spaltungsprodukte fehlt uns also noch. Die quantitative Bestimmung ist eben in Folge der Verluste, die sich nicht umgehen lassen, und aus Mangel an präzisen Methoden zur Isolirung der einzelnen Spaltungsprodukte sehr erschwert. Ich möchte diese Untersuchung nur als den Anfang zu meinen weiteren Arbeiten über die möglichst genaue Bestimmung der einzelnen Spaltungsprodukte ansehen. Denn nur auf diese Weise wird es gelingen, nach und nach alle im Eiweissmolekül vorhandenen Radicale zu isoliren. Das Hämoglobin wird sich als Ausgangsmaterial am besten dazu eignen, da es leicht in grösseren Mengen rein zu gewinnen ist. Reines Material ist ein Hauptfactor, denn nur auf solchem kann eine genaue quantitative Bestimmung der einzelnen Spaltungsprodukte fussen.

Ueber die quantitative Bestimmung des Phenols im Harn.

Von

Carl Neuberg in Berlin.

(Aus dem chem. Laborat. d. patholog. Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 17. Februar 1899.)

Ueberblickt man die in der Litteratur vorhandenen Angaben über die Quantität des im Harn in pathologischen Fällen enthaltenen Phenols,¹⁾ so fallen die verhältnissmässig ausserordentlich hohen Zahlen für den Diabetes mellitus auf. So hat A. Strasser²⁾ in fünf Fällen von Diabetes ausnahmslos eine hohe Phenolausscheidung beobachtet, in einem Falle im Maximum 0,6935 gr. während 24 Stunden. Da nicht abzusehen ist, warum die Entstehung des Phenols gerade beim Diabetes so ausserordentlich gesteigert sein soll, so liegt der Gedanke nahe, dass diese Vermehrung nur eine scheinbare, durch die Methode bedingte sein könne. In der That macht Huppert³⁾ zu den Zahlen von Strasser die Bemerkung: «hier ist offenbar das Aceton mitbestimmt worden». Allein Strasser hat die im Huppertschen Laboratorium ausgearbeitete Methode von Kossler und Penny⁴⁾ benutzt, bei welcher das Aceton ausgeschlossen ist.

Das Verfahren von Kossler⁵⁾ und Penny besteht nun darin, dass man aus dem Harn durch Eindampfen bei alkalischer

1) Phenol als Sammelbegriff für Phenol u. Kresol.

2) Zeitschr. f. klin. Medic. Bd. 24, S. 543.

3) Huppert, Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 149.

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 117.

5) In Folge eines Druckfehlers ist im «Huppert» statt Kossler stets Kossel gesetzt.

Reaction zuerst das Aceton entfernt, dann nach dem Ansäuern wiederholt destillirt, die im Destillat etwa vorhandene salpetrige Säure und Ameisensäure durch Schütteln mit kohlensaurem Kalk an Calcium bindet und nochmals destillirt. Das Destillat wird dann mit $\frac{1}{10}$ KOH alkalisch gemacht und in der Wärme mit einer abgemessenen, hinreichend grossen Menge $\frac{1}{10}$ Normaljodlösung versetzt, welche alles Phenol als Trijodphenol zur Abscheidung bringt; nach dem Erkalten säuert man an und titirt den Ueberschuss an Jod mit einer auf die Jodlösung eingestellten Natriumthiosulfatlösung zurück.

Demnach wird bei normalem Verfahren das Aceton als Fehlerquelle ausgeschlossen. Vielleicht hat Huppert im Sinn, dass durch das Eindampfen bei alkalischer Reaction etwas Acetessigsäure zurückbleiben könnte, die dann beim Destilliren nach dem Ansäuern Aceton in das Destillat liefern würde.

Aber es ist noch eine andere Erklärung dieser hohen Resultate denkbar, auf die mich Herr Prof. E. Salkowski aufmerksam machte, indem er mich zur Untersuchung der einschlägigen Verhältnisse aufforderte.

Derselbe¹⁾ hat vor einiger Zeit gefunden, dass Trauben- und Fruchtzucker bei der Destillation mit verdünnten Säuren Substanzen von keton- oder aldehydartiger Natur geben, die mit Jodlösung unter Bildung deutlich wahrnehmbarer Mengen von Jodoform reagiren, also beim Kossler- und Penny'schen Verfahren jodbindend wirken und somit entsprechend dem Zuckergehalt des Harns, Fehler bedingen müssen.

Huppert gedenkt der Möglichkeit dieser Fehlerquelle allerdings auch, ist aber der Ansicht, dass dieselbe bei Innehaltung der von Kossler und Penny gegebenen Vorschriften nicht in Betracht komme. Er²⁾ sagt: «Die durch die fremden Substanzen verursachten Fehler lassen sich aber vermeiden, wenn man zur Gewinnung des Phenols aus dem Harn in folgender Weise verfährt.»

1) E. Salkowski, Pflügers Arch., Bd. 56, S. 339. (1894).

2) Huppert, Analyse des Harns, 10. Aufl. 1898, S. 786.

Es ist indessen nicht abzusehen, in welcher Weise das empfohlene Verfahren auf die Vermeidung des Fehlers hinwirken könnte. Jedenfalls bedurfte die Frage der Untersuchung.

Bevor diese vorgenommen wurde, schien es angebracht, die Genauigkeit des Verfahrens von Kossler und Penny noch einmal zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurden 1,1 gr. reinsten Phenols vom Siedepunkt 183° und 1,0 gr. p-Kresol vom Siedepunkt 198° nach sorgfältiger Trocknung über Schwefelsäure genau abgewogen, in Wasser gelöst und zum Liter aufgefüllt. Von diesen beiden Lösungen wurden 10 resp. 5 ccm. mehrmals zur Titration gebracht und folgendes Resultat erhalten:

A.

a) Phenollös.	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Im Durchschnitt	Gefunden ¹⁾ :	Berechnet:
10 ccm.	10	15,0	7,9	7,1	verbrauchten		
10 "	8	15,0	8,0	7,0	10 ccm.	Phenol	Phenol
5 "	5	7,6	4,2	3,4	Phenollös.	= 0,0110 gr.	= 0,0110 gr.
10 "	10	13,0	5,8	7,2	7,025 ccm. $\frac{1}{10}$ J.		

b) p-Kresollös.	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Im Durchschnitt	Gefunden ¹⁾ :	Berechnet:
10 ccm.	10	15,0	9,4	5,6	verbrauchten		
10 "	10	15,0	9,5	5,5	10 ccm.	p-Kresol	p-Kresol
5 "	5	7,0	4,8	2,7	Parakresollös.	= 0,0098 gr.	= 0,0100 gr.
10 "	10	15,0	9,7	5,3	5,46 ccm. $\frac{1}{10}$ J.		

Durch diese Zahlen ist die ausserordentliche Schärfe der Methode für die Bestimmung beider Phenole ausser Zweifel gesetzt.

Um nun experimentell den vermutheten Einfluss des aus den Kohlehydraten abgespalteten halogenbindenden Produkts auf die maassanalytische Bestimmung der Harnphenole zu erweisen, wurde folgendermaassen verfahren.

Von 1500 ccm. normalen Harns wurde der Phenolgehalt in 3 Portionen zu je 200 ccm. nach der Methode von Kossler und Penny bestimmt, wobei das auf 100 ccm. abdestillirte

¹⁾ 1 ccm. verbrauchter $\frac{1}{10}$ N-Jodlösung entspricht 0,0015670 gr. Phenol oder 0,0018018 gr. p-Kresol.

B.

Flüssigkeitsvolumen mehrmals zu 200 ccm. wieder ergänzt wurde.

Harn	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ Na ₂ S ₂ O ₃	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.	Im Mittel ver- braucht 5,6 ccm. Jodlösung.
200 ccm.	10	16,0	10,6	5,4	3	
"	15	25,0	19,8	5,2	3	
"	15	25,0	18,8	6,2	4	

Die 3 untereinander befriedigend übereinstimmenden Versuche ergeben also, da 1 ccm. Jodlösung = 0,0015670 gr. Phenol oder = 0,0018018 gr. p-Kresol, für die Tagesmenge von 1500 ccm. im Mittel:

$$15./2. \ 5,6. \ 0,0015670 = 0,0658 \text{ gr. Phenol, resp.}$$

$$15./2. \ 5,6. \ 0,0018018 = 0,0757 \text{ gr. Parakresol.}$$

Nun wurde in 3 weiteren Portionen desselben normalen Harns nach Zusatz von 2 gr. Traubenzucker auf 200 ccm. Urin die Phenolmenge unter sonst gleichen Bedingungen wie vorher ermittelt:

C.

Harn 200 ccm. + 2 gr. Dextrose	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ Na ₂ S ₂ O ₃	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.	Im Durchschnitt verbraucht 8,4 ccm. Jodlösung.
	15	30,0	22,0	8,0	3	
"	15	25,0	17,0	8,0	3	
"	15	25,0	15,7	9,3	4	

Diese Tabelle, die einen gerade $1\frac{1}{3}$ mal so hohen Werth für die Phenolmenge ergeben würde, als Tabelle B, zeigt deutlich einen Mehrverbrauch an Jod und zugleich die Abhängigkeit desselben von der Anzahl der ausgeführten Destillationen.

Um nun die Möglichkeit auszuschliessen, die Zunahme jodbindender Produkte einer Reaction des Traubenzuckers mit irgend welchen Bestandtheilen des Harns zuzuschreiben und nicht auf Kosten einer Spaltung durch die angewandte Schwefelsäure zu setzen, wurde der Versuch viermal mit 10 ccm. der zur Aufstellung der Tabelle A benutzten Phenollösung unter Zusatz von 200 resp. 300 ccm. 1%iger Dextroselösung und 5 ccm. concentrirter Schwefelsäure für 100 ccm. Flüssigkeit wiederholt. Durch reines Wasser wurde das ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen stets wiederhergestellt, wenn dasselbe von 300 ccm. auf 150 resp. von 200 ccm. auf 100 gesunken war. Das Destillat wurde dann über kohlen saurem Kalk rectificirt und titirt:

D.

Phenol + 1% Traubenzuckerlösung.	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.
10 ccm. $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ -Lös. + 200 ccm. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ -Lös.	15	25,0	15,4	9,6	3
„ „ „	12	20,0	10,6	9,4	3
„ „ „	15	20,0	9,7	10,3	4
10 ccm. $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ -Lös. + 300 ccm. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ -Lös.	20	28,0	11,9	16,1	6

Da nach Tabelle A 10 ccm. der angewandten Phenollösung im Durchschnitt 7,025 ccm. Jodlösung verlangen, so ergab dieser Versuch nun unzweideutig die langsam sich hinziehende Abspaltung von Produkten aus dem angewandten Kohlehydrat, die mit der Hypojoditlösung in Reaction traten. Zugleich stand der Mehrverbrauch an Jod gegen Tabelle A — etwa 2,5 ccm. für dreimalige Destillationen und 3,3 für eine viermalige — in angenäherter Uebereinstimmung mit dem aus Tabelle C gegen B gefundenen von 2,7 resp. 3,1 ccm.

Diese Ergebnisse zwingen nun zu dem Schluss, dass die Methode von Kossler und Penny bei Anwesenheit von Traubenzucker im Urin zu falschen und zwar zu hohen Werthen führt, und dass die Steigerung der Phenolausscheidung, die man bei Diabetes beobachtet haben will, wohl auf einem durch das Verfahren bedingten Trugschluss beruht.

Es wurde nun versucht, quantitativ die Menge jodbindender Produkte zu bestimmen, die unter gleichen Bedingungen aus einer gewogenen Menge Traubenzucker bei der Methode von Kossler und Penny durch dieselbe Menge Säure, d. h. 5 ccm. concentr. H_2SO_4 auf 100 ccm. Flüssigkeit, bei gleicher Zahl von Destillationen gebildet wird.

Die schwach sauer reagirenden Destillate wurden über Calciumcarbonat von gleichzeitig entstandenen flüchtigen Säuren befreit und folgendermassen zur Titration gebracht.

Nach dem Versetzen mit $\frac{1}{10}$ Kalilauge bis zur stark alkalischen Reaction wurde $\frac{1}{10}$ Jodlösung im Ueberschuss bis zur deutlichen Braunfärbung hinzugefügt und die Lösung in einer starken Stöpselflasche etwa 15 Minuten auf dem Wasserbad

erwärmt, wobei das Glas mit einem Leinwandtuch umwickelt war. Nach langsamer Abkühlung wurde das überschüssige Jod nach dem Ansäuern durch verdünnte Schwefelsäure mittelst $\frac{1}{10}$ Thiosulfat zurücktitriert. So ergaben sich folgende Zahlen:

E.

2 gr. Dextrose in 200 H ₂ O	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ Na ₂ S ₂ O ₃	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.
	10	15	13,0	2,0	3
"	15	20	17,3	2,7	3
"	15	20	17,5	2,5	3
"	15	20	18,2	1,8	3
"	12	18	15,9	2,1	3
"	12	15	13,7	1,3	2
"	15	20	18,4	1,6	2
"	12	18	17,1	0,9	2
"	15	20	19,0	1,0	2
1 gr. Dextrose in 200 H ₂ O	10	15	14,2	0,8	3
"	7	11	9,9	1,1	3
"	7	11	9,7	1,3	3
"	8	12	10,5	1,5	4
"	8	12	9,9	2,1	4
"	7	11	9,0	2,0	2

Die starken Schwankungen in den Resultaten machten die Aufstellung einer Correctionstabelle für Procente Traubenzucker unmöglich, auch wäre der Werth einer solchen illusorisch, falls andere sowohl im normalen wie pathologischen Harn vorkommende Kohlehydrate, deren Menge nicht leicht zu bestimmen ist, ebenfalls unter dem Einfluss der Schwefelsäure bei der Destillation jodbindende Produkte abspalten.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden einige der in Betracht kommenden Kohlehydrate¹⁾ nach dieser Richtung untersucht und hierbei genau so, wie vor Tabelle E angegeben ist, verfahren. Destillat wie destillirende Flüssigkeit blieben stets rein weiss und klar, nur bei der Fructose färbte sich

¹⁾ Alle angewandten Kohlehydrate waren rein und besonders auf einen von der Darstellung her ihnen etwa anhaftenden Gehalt an Alkohol und Aceton untersucht.

der Kolbeninhalt nach Zufügen der Schwefelsäure bald gelb und schied wenig dunkle Huminsubstanzen aus:

F. Fructose.

	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.
2 gr. Fr. in 200 H_2O	10	15,0	11,0	4,0	3
„	15	25,0	17,9	7,1	4
1 gr. Fr. in 200 H_2O	10	12,0	9,8	2,2	3

G. Milchzucker.

	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.
2 gr. Milchz. in 200 H_2O	20	25,0	22,9	2,1	2
„	15	10,0	7,7	2,3	3
1 gr. Milchz. in 200 H_2O	15	20,0	18,6	1,4	3

H. Glycogen.

	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Anzahl d. Destill.
0,5 gr. Glycogen in 200 H_2O	15	22,0	17,8	4,2	4
0,25 gr. Glycogen in 200 H_2O	8	12,0	10,3	1,7	3
„	5	10,0	8,9	1,1	3

Ausserdem ist noch auf die den Kohlehydraten nahe-
stehende Glucuronsäure Rücksicht zu nehmen. Da die im Harn
auftretenden gepaarten Glucuronsäuren durch verdünnte Mineral-
säuren in der Wärme in ihre Componenten gespalten werden,
die freie Glucuronsäure aber nach Tolleus und seinen Schülern ¹⁾
bei der Destillation mit Säuren reichlich Furfurol bildet, so
enthalten ihre Destillate stets ein jodbindendes Produkt, ganz
davon abgesehen, dass der zweite Bestandtheil in vielen Fällen
gleichfalls flüchtig ist und mit Halogen reagirt.

Die Zahlen der Tabellen F, G und H zeigen nun ohne
Weiteres, dass der nach der Methode von Kossler und Penny
abgeleitete Werth für die Phenolmenge nicht nur in patho-
logischen Fällen, sondern auch für den normalen Harn in Folge
stets anwesender Kohlehydrate eine Entstellung erfährt, die

¹⁾ Dissert. von A. Günther u. G. de Chalmot, Göttingen 1891;
Dissert. von F. Mann, Göttingen 1894.

so gross ist, dass die Benutzung des Verfahrens in der bisherigen Form unzulässig erscheint.

Anfangs blieben alle Bemühungen erfolglos, die durch ihre Genauigkeit wie Bequemlichkeit gleich ausgezeichnete Methode von Kossler und Penny auch für den Fall der Anwesenheit von Kohlehydraten in einfacher Weise brauchbar zu machen, so dass auch der Kliniker nicht vor ihrer Anwendung zurückzuschrecken brauchte.

Denn eine wirksame Zerstörung der Kohlehydrate vor Einwirkung der Schwefelsäure auf die Phenolschwefelsäuren konnte nicht erreicht werden. Die Entfernung eines gährungsfähigen Zuckers mittelst Hefe scheitert an der störenden Alkoholbildung. Die Versuche, die im Harndestillat vorhandenen Körper von Aldehyd- oder Keton-Natur durch Metalloxyde fortzuoxydiren erwiesen sich als unausführbar wegen der Eigenschaft des Phenols und in noch höherem Maasse des p-Kresols, durch alkalische Kupferlösung, ammoniakalische Silberlösung und gefälltes Silberoxyd gleichfalls oxydirt zu werden, während Quecksilberoxyd, Bleisuperoxyd und Wasserstoffoxyd die jodbindende Substanz nur unvollkommen angriffen. Auch starkes Alkali hatte nicht die gewünschte Wirkung, denn in manchen Fällen trat wohl Gelbfärbung, vielleicht in Folge Bildung von Aldehydharz, ein, aber selbst nach 48stündigem Stehen waren die störenden Produkte nicht verschwunden oder bildeten sich nach dem Ansäuern zum Theil zurück. Für alle Fälle anwendbar erwies sich allein folgender Weg.

Genau nach den Angaben von Kossler und Penny werden die Phenole in dem von Aceton befreiten Harn¹⁾ aus den Phenolschwefelsäuren freigemacht und abgetrieben, das Destillat wird über Calciumcarbonat zur Entfernung von salpetriger Säure und Ameisensäure rectificirt und dann wie folgt behandelt.

In einem 2-Literkolben wird das Gemenge der Phenole und der durch die Destillation aus den Kohlehydraten entstandenen jodbindenden Produkte mit einem grossen Ueber-

¹⁾ Die Entfernung des Acetons an dieser Stelle ist nicht unbedingt erforderlich, empfiehlt sich aber, um nachher ein leicht ungünstig wirkendes längeres Erwärmen des Bleiphenolats zu umgehen.

schuss von lufttrockenem, hydratischem Bleioxyd (3 gr.), das mit Barytlösung aus Bleinitrat frisch zu fällen ist, und 5 ccm. einer concentrirten Lösung von basischem Bleiacetat oder, statt beider, mit einer Auflösung von 1 gr. Aetznatron und 6 gr. festem Bleizucker versetzt und etwa 15 Minuten auf einem lebhaft siedenden Wasserbad erhitzt. Hierbei löst sich ein Theil des Bleioxyds in den Phenolen zu basischen Bleiphenolaten, während die leicht flüchtigen Aldehyde entweichen. Zur vollständigen Entfernung der Letzteren erhitzt man den Kolbeninhalt noch kurze Zeit am absteigenden Kühler auf freier Flamme, bis wenige Cubikcentimeter des übergelassenen Destillats ammoniakalisch-alkalische Silberlösung nicht mehr reduciren, was gewöhnlich nach etwa 5 Minuten der Fall ist. Ein unnöthig langes Erhitzen ist zu vermeiden, da bei anhaltender Erwärmung die Bleiphenolate in ihre Componenten zerfallen. Man säuert nun den Kolbeninhalt stark mit verdünnter Schwefelsäure an und destillirt die Phenole unter zweimaliger Ergänzung der Flüssigkeitsmenge durch Wasser ab.

Das Destillat wird nun wieder nach den Angaben von Kossler und Penny behandelt, d. h. mit Alkali übersättigt und nach dem Erwärmen auf dem Wasserbad in einer grossen Stöpselflasche sogleich mit $\frac{1}{10}$ Normal-Jodlösung im Ueberschuss versetzt, der in der Kälte nach dem Ansäuern mit $\frac{1}{10}$ Thiosulfat zurücktitrirt wird.

Die Brauchbarkeit dieser Abänderung wurde mit der zu Tabelle A verwandten Phenollösung von 1,1 gr. im Liter und der p-Kresollösung von 1,0 gr. im Liter unter Zusatz eines Gemisches von Aceton, Acetaldehyd und Furfurol oder auch direkten Zuckerdestillats erwiesen:

J.

a	Phenoll.	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch	Im Mittel verbr.: J = 6,9 ccm. Gefunden: Phenol = 0,0108 gr. Berechnet: Phenol = 0,0110 gr.
	10 ccm.	10	15,0	8,2	6,8	
	10 „	12	18,0	10,9	7,1	
	10 „	10	15,0	8,3	6,7	
b)	p-Kresoll.	$\frac{1}{10}$ KOH	$\frac{1}{10}$ J	$\frac{1}{10}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Jodverbrauch.	Im Mittel verbr.: J = 5,0 ccm. Gefunden: p.-Kresol = 0,0091 gr. Berechnet: p.-Kresol = 0,0100 gr.
	10 ccm.	10	15,0	10,1	4,9	
	10 „	10	15,0	9,7	5,3	
	10 „	10	15,0	10,0	5,0	

Können auch die beim p-Kresol erzielten Resultate keinen Anspruch auf absolute Genauigkeit erheben, so besitzen sie doch, wie durch Kontrollversuche festgestellt wurde, mindestens denselben Werth wie eine gewichtsanalytische Bestimmung, die folgendermaassen ausgeführt wurde.

100 ccm. der 1 gr. im Liter enthaltenden p-Kresollösung wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit einem mässigen Ueberschuss von Bromwasser versetzt und sofort verkorkt; nach etwa 48 Stunden wurde der erhaltene krystallinische Niederschlag auf einem gewogenen Filter gesammelt, über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen:

Gefunden I. 0,2701 gr.

II. 0,2773 „

Da sich nach Baumann und Brieger¹⁾ der zuerst entstandene amorphe Niederschlag von $C_6H(CH_3)Br_3OBr$ unter Wasser nach etwa 2 Tagen ein fast reines krystallinisches $C_6H_2Br_3OH$ verwandelt hat, so ergibt sich aus obigen Zahlen:

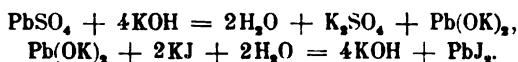
$$\begin{array}{l} \text{I} = 0,0881 \text{ gr. } C_6H_4(CH_3).OH \\ \text{II.} = 0,0907 \text{ „ } C_6H_4(CH_3).OH \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{I} \\ \text{II.} \end{array}} \right\} \text{berechnet } 0,1000 \text{ gr. } C_6H_4(CH_3).OH.$$

Auch an Harn wurde die Brauchbarkeit des abgeänderten titrimetrischen Verfahrens erprobt. Zu diesem Zwecke wurde der Phenolgehalt in 500 ccm. Harn nach gegebenen Vorschriften ermittelt und zu 0,0118 gr. gefunden. Dann wurde derselbe nach Zusatz von 5 gr. Traubenzucker zu derselben Menge Urin abermals bestimmt, und fast übereinstimmend wurden 0,0109 gr. erhalten, während Kossler's und Penny's Methode in ebenfalls 500 ccm. desselben Harns, nach Zufügen von 5 gr. Dextrose, eine scheinbare Phenolmenge von 0,0298 gr. ergab.

Brauchbare Resultate erhält man auch, wenn man die Phenole nach Entfernung des Bleisulfats durch Filtration, ohne sie abzudestilliren, direkt in der schwefelsauren Lösung bestimmt, d. h. diese mit Alkali übersättigt und dann, wie oben angegeben, mit Jod und Thiosulfat behandelt. Ein Abfiltriren des Bleisulfats ist aber unbedingt erforderlich, da in Folge einer Wechselwirkung zwischen $PbSO_4$, KOH und KJ ein Theil des Jods der

1) Baumann u. Brieger. Ber. d. d. chem. Ges. Bd. XII, S. 805.

titrimetrischen Bestimmung verloren gehen würde. Denn Bleisulfat löst sich in Kalilauge zu Kaliumplumbit, das sich mit Jodkalium zu Bleijodid umsetzt; dieses bleibt in der alkalischen Flüssigkeit gelöst und wird nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure als schwerlöslicher gelber Niederschlag gefällt, der sich mit Schwefelsäure nicht oder nur unvollkommen zu Bleisulfat und Jodwasserstoff umsetzt, ein Vorgang, den nachstehende Gleichungen wiedergeben:



Es bot nun Interesse, die Resultate der neuen Methode bei Versuchen mit menschlichem Harn, kurz mit den Ergebnissen älterer Forschung zu vergleichen, die sich unvollkommenerer Verfahren bedient hatte.

Zu diesem Zweck wurde in der 24stündigen Menge normalen Harns von demselben Individuum an 3 aufeinander folgenden Tagen bei gleichmässiger, gemischter Kost der Phenolgehalt bestimmt und folgendes Ergebniss erhalten:

- I. 0,0324 gr. Phenol in 1530 ccm. Harn
- II. 0,0350 „ „ „ 1485 „ „
- III. 0,0322 „ „ „ 1570 „ „

Als Mittelwert aus diesen wenigen Bestimmungen würde für die Höhe der täglichen Phenolausscheidung 0,0332 gr. folgen.

Der einzige zur Zeit zur Verfügung stehende Diabetes-harn mit 1,5% Zucker zeigte für die 24stündige Urinmenge von 1600 ccm. einen Phenolgehalt von 0,0368 gr.

Diese Zahlen nähern sich nun ausserordentlich dem von J. Munk¹⁾ auf gewichtsanalytischem Wege gefundenen Mittelwerth von 0,0270 gr.

Nun kann aus den im Verlaufe dieser Untersuchung erörterten Gründen die Munk'sche Bestimmung trotz der Schwierigkeit, ein einheitlich zusammengesetztes Produkt zur

1) Arch. f. Physiol. 1880. Suppl. S. 28.

Wägung zu bringen, grösseren Anspruch auf Genauigkeit erheben, als irgend ein nach den alten titrimetrischen Verfahren erhaltenes Resultat.

Denn flüssiges Bromoform, das etwa durch Einwirkung von Brom auf die durch Destillation aus Kohlehydraten abgespaltenen Substanzen von Keton- oder Aldehyd-Natur entstehen kann, vermag die analytischen Daten nur durch sein Lösungsvermögen für Tribromphenol unbedeutend zu beeinträchtigen.

Ueber die Natur jener wiederholt erwähnten halogenbindenden Produkte von Aldehyd- oder Keton-Natur hoffe ich in kurzer Zeit berichten zu können.

=====

Weiteres über die quantitative Bestimmung des Harnindikans.

Von
Eyvin Wang.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität zu Kristiania.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Februar 1899.)

In einer vorläufigen in dieser Zeitschrift veröffentlichten Mittheilung¹⁾ habe ich eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Harnindikans beschrieben.

Diese Methode beruht darauf, dass indoxylschwefelsaures Kalium durch concentrirte Salzsäure gespalten, das frei gemachte Indoxyl durch Eisenchlorid oxydirt und der gebildete Indigo in statu nascendi mit Chloroform extrahirt wird; nach dem Abdestilliren des Chloroforms wird der Indigo durch concentrirte Schwefelsäure in Indigosulfosäure übergeführt, um schliesslich im Wasser gelöst mit Kaliumpermanganat titrimetrisch bestimmt zu werden.

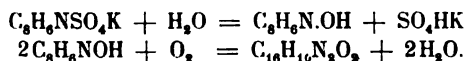
Parallelanalysen nach dieser Methode stimmten unter einander sehr befriedigend:

Pro 250 ccm. Harn		Pro Tag	
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
2,89 mgr.	2,77 mgr.	15,5 mgr.	15,1 mgr.
5,53 „	5,47 „	53,5 „	53,0 „
0,98 „	0,88 „	5,9 „	5,3 „
2,70 „	2,76 „	10,8 „	11,0 „
1,41 „	1,40 „	7,60 „	7,55 „
1,08 „	1,06 „	6,16 „	6,04 „
0,75 „	0,57 „	10,4 „	7,9 „
1,18 „	1,22 „	7,9 „	8,2 „
1,52 „	1,56 „	15,2 „	15,6 „
1,78 „	1,84 „	25,3 „	26,1 „

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 406.

Um einwandfreie Kontrollanalysen ausführen zu können, habe ich öfters indoxylschwefelsaures Kalium darzustellen versucht. Zu diesem Zwecke habe ich theils grosse Quantitäten indikanreichen Menschenharn (etwa 20 l. bei jedem Versuche) und theils Kaninchenharn bearbeitet; letzterer war durch Fütterung mit Orthonitrophenylpropionssäure sehr indikanreich gemacht worden. (Zwei Kaninchen bekamen im Laufe einer Woche etwa 20 gr.) Die Harne wurden nach den von Baumann¹⁾ und G. Hoppe-Seyler²⁾ angegebenen Methoden behandelt, ohne dass es mir gelungen wäre, weiter als zu einem sehr indikanreichen Alkoholextract zu kommen, welches zwar keine Sulfatschwefelsäure, jedoch, wie aus dem Folgenden erhellt, viel mehr Aetherschwefelsäure enthielt, als der vorhandenen Menge Indigo entsprechen würde.

Das Alkoholextract aus Kaninchenharn wurde auf dem Wasserbade bis zum Trocknen eingedampft und im Wasser gelöst. Ein Theil dieser wässerigen Lösung wurde zur Aetherschwefelsäurebestimmung verwendet; als BaSO₄ wurde 0,0082 gr. gefunden, was 0,00883 gr. C₈H₆NSO₄K entspricht. Letzteres setzt sich nach Baumann und Brieger³⁾ folgender Weise in Indigo um:



Die berechnete Menge indoxylschwefelsaures Kalium (0,00883 gr.) entspricht also 0,0046 gr. Indigo. In einem gleich grossen Quantum wässriger Lösung wurde aber die Indigomenge durch Titrirung nur zu 0,00288 gr. gefunden.

Dieselbe Untersuchung des Alkoholextractes aus Menschenharn gab ein ähnliches Resultat:

Aetherschwefelsäure als BaSO₄ = 0,0168 gr., 0,00944 gr. Indigo entsprechend. Bei Titrirung wurde aber nur 0,0076 gr. Indigo gefunden.

Ausserdem habe ich die synthetische Darstellung des in-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 255.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 423.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 258.

doxylschwefelsauren Kaliums nach Thesen⁴⁾ aus Phenyl-o-carbonsäure und pyroschwefelsaurem Kalium versucht, jedoch mit negativem Resultat.

In Ermangelung reiner Substanz musste ich mich zur Ausführung von Kontrollanalysen mit den indikanreichen Harn-extracten begnügen, Analysen, die, wie aus Folgendem hervorgeht, gut übereinstimmende Resultate lieferten:

- I. 50 ccm. Extract wurden auf dem Wasserbade getrocknet und in 250 ccm. Wasser gelöst; gefunden 7,5 mgr. Indigo.

Die gleiche Menge in 250 ccm. indikanfreiem Harn gelöst; gefunden 7,4 mgr.

- II. Der Indigogehalt eines normalen Harnes und eines indikanhaltigen Extractes wurden getrennt bestimmt:

250 ccm. Harn enthielten 3,52 mgr. Indigo

50 „ Extract „ 0,53 „ „

In einer Mischung von 150 ccm. Harn + 100 ccm. Extract wurde gefunden: 3,24 mgr. Indigo
berechnet: 3,17 „ „

Diese Versuche und die oben angeführten Parallelanalysen gestatten scheinbar den Schluss, dass die Methode zuverlässig ist. Weitere Untersuchungen haben mir indessen gezeigt, dass dies nicht immer der Fall ist.

Zur Erlangung genauer Resultate ist es vor Allem nothwendig, dass in das Chloroform keine Harnbestandtheile übergehen, welche in concentrirter Schwefelsäure löslich sind oder mit derselben Verbindungen geben, die auf die Titrirung störend einwirken. Derartige Beimengungen können aber in dem eingetrockneten Chloroformextract in der That nachgewiesen werden. Die nach oben erwähneter Methode zur Titrirung fertige Lösung, die nur Indigosulfosäure enthalten sollte, besitzt nämlich noch nicht die rein blaue Farbe einer aus reinem Indigotin dargestellten gleichwerthigen Lösung und die Titration gibt dementsprechend höhere Resultate wie colorimetrische Parallelbestimmungen. Um die genannten Beimengungen zu entfernen,

⁴⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XXIII, S. 23.

ist es daher nothwendig, das Chloroformextract noch einer weiteren Reinigung zu unterwerfen, nämlich Waschen mit Aetheralkoholwasser, dann erst Lösen in Schwefelsäure und endlich Filtrirung der wässerigen Indigosulfosäure. Ich werde nachstehend die Motivirung und Beschreibung dieses Reinigungsverfahrens geben:

Durch Behandlung des getrockneten Chloroformrückstandes, der im Kolben neben abgesetztem Indigoblau einen rothbraunen Belag bildet, mit einer Mischung von Aether, Alkohol (96%) und Wasser zu gleichen Volumtheilen werden die rothbraunen Antheile sehr leicht gelöst (sind demnach wohl nicht als Indigofarbstoffe anzusehen). Der Indigo bleibt ungelöst und die braune Lösung wird — um suspendirte Indigopartikelchen nicht zu verlieren — durch ein kleines Filter abgesehen. Das Filter wird nach dem Trocknen mit Chloroform mehrmals ausgekocht, das Chloroform — um Papierfasern zurückzuhalten — wieder in den Indigokolben hineinfltrirt und abdestillirt. Nach Zusatz von concentrirter Schwefelsäure und Auflösung in Wasser resultirt eine schön blaue, jetzt rein indigofarbene Flüssigkeit, die aber noch nicht vollständig von fremden Körpern befreit ist. Zuweilen sind nämlich in der klaren Flüssigkeit kleine, glänzende, anscheinend krystallinische Blättchen oder Schuppen wahrnehmbar. Deshalb wird filtrirt und dann erst ist die Lösung zum Titriren geeignet. Die Titiranalysen und colorimetrischen Bestimmungen geben jetzt, wie die folgende Tabelle zeigt, identische Zahlen:

Harnmenge	Titrimetrisch	Colorimetrisch
530 ccm.	3,04 mgr. Indigo	2,91 mgr. Indigo
720 „	1,26 „ „	1,23 „ „
750 „	0,69 „ „	0,70 „ „
640 „	0,79 „ „	0,77 „ „
290 „	3,59 „ „	3,51 „ „
440 „	1,72 „ „	1,79 „ „
1620 „	4,17 „ „	4,70 „ „
600 „	0,82 „ „	0,81 „ „
800 „	3,76 „ „	3,65 „ „
600 „	0,70 „ „	0,72 „ „

Während ich mit diesen Untersuchungen beschäftigt war, habe ich aus den Bemerkungen des Herrn Dr. Obermayer

zu meiner vorläufigen Mittheilung¹⁾ erfahren, dass genannter Autor mit mir gleichzeitig mit der Bestimmung des Harnindikans gearbeitet hat, und dass wir beide denselben Weg eingeschlagen haben. Die Nothwendigkeit einer Befreiung des Chloroform-residuums von fremden Beimengungen ist Obermayer nicht entgangen. Zu diesem Zwecke wäscht er den Rückstand mit 45 %igem Alkohol. Eine derartige Alkoholbehandlung dürfte jedoch zur vollständigen Entfernung der Verunreinigungen nicht genügen. Der nach Obermayer mit Alkohol ausgewaschene Rückstand gibt nämlich noch an die von mir verwendete Mischung von Aether, Alkohol und Wasser Substanzen ab, die in Schwefelsäure gelöst auf Kaliumpermanganat reducierend wirken. Es werden daher — wie aus folgenden Parallelversuchen hervorgeht — noch zu hohe Indigozahlen erhalten.

a) Reinigung mit Alkohol		b) Reinigung mit Aether-Alkohol-Wasser	
Titrimetrisch	Colorimetrisch	Titrimetrisch	Colorimetrisch
0,465 mgr.	0,350 mgr.	0,350 mgr.	0,368 mgr.
0,435 »	0,368 »	0,360 »	0,375 »
0,510 »	0,288 »	0,290 »	0,308 »
0,390 »	0,240 »	0,220 »	0,212 »
0,310 »	0,192 »	0,190 »	0,182 »

Dass die Alkoholbehandlung nicht zur vollständigen Reinigung genügt, wird eigentlich von Obermayer selbst angedeutet. Es heisst nämlich in seiner vorläufigen Mittheilung: ¹⁾ «Beim Zugiessen der Schwefelsäure wird der Rückstand zunächst braun», und ferner: «Die zu titirende Flüssigkeit darf nur leicht getrübt sein». — Reines Indigotin gibt aber mit concentrirter Schwefelsäure zuerst eine grüne Farbe und die Lösung von reiner Indigosulfosäure ist nie getrübt.

Eine genaue Bestimmung des Harnindikans wird man also nach folgendem Verfahren erzielen:

1. Der Harn wird mit 20 %iger Bleizuckerlösung gefällt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 427.

¹⁾ Wiener klin. Rundschau, 1898, Nr. 34, S. 537.

2. Das klare Filtrat wird mit dem gleichen Volumen von Obermayer's Reagens im Scheidetrichter versetzt, das gebildete Indigo mit Chloroform extrahirt und in einen Kolben gesammelt.

3. Das Chloroform wird abdestillirt und der Rückstand nach Erkalten mit einer Mischung von gleichen Raumtheilen Aether, Alkohol und Wasser ausgewaschen. Die in der Waschflüssigkeit aufgeschwemmten Indigotheilchen werden auf einem kleinen Filter gesammelt und das Filtrum getrocknet.

4. Das getrocknete Filtrum wird mit Chloroform ausgekocht, bis sich alles Indigo gelöst hat. Diese Indigolösung wieder in den Kolben hineinfltrirt.

5. Nochmals Abdestilliren des Chloroforms und Zusatz von concentrirter Schwefelsäure.

6. Nach Verlauf einiger Stunden Verdünnung mit Wasser, Filtration und Titrirung.

Kristiania, den 17. Februar 1899.

— — — — —

Ueber die sogenannten Ligninreactionen des Holzes.

Von
Friedrich Czapek.

(Aus dem botanischen Institute der deutschen technischen Hochschule in Prag.)

(Der Redaction zugegangen am 5. März 1899.)

Die zahlreichen schönen Farbenreactionen, welche an verholzten Zellmembranen auf verschiedenem Wege zu erzielen sind, lassen sich auf keine der bisher aus Holz dargestellten Substanzen mit Sicherheit beziehen. Ueber ihre Ursachen bestehen heute nur mehr weniger gut begründete Vermuthungen. Bei dem allgemeineren grossen Interesse der Holzchemie wird es vielleicht nicht unwillkommen erscheinen, wenn ich in Kürze über den derzeitigen Stand der Sache kritisch referire. Dabei will ich die Arbeiten aus älterer Zeit, welche nur historisches Interesse darbieten, unberücksichtigt lassen; man findet dieselben übrigens mehrfach zusammengestellt, wie in dieser Zeitschrift von G. Lange,¹⁾ ferner in den Werken von Sachsse,²⁾ Tollens,³⁾ Ebermayer⁴⁾ u. a. a. O.

Dass das Holz dieselbe Cellulose enthält, wie Pflanzenzellmembranen sonst, ist vielfach sichergestellt worden. Vielen älteren Autoren gelang es bereits, durch eingreifende Behandlung des Holzes mit Salpetersäure (Payen 1839) oder mit einem Gemisch aus verdünnter Salpetersäure mit Kaliumchlorat

¹⁾ G. Lange, Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. XIV, S. 15 (1889).

²⁾ Sachsse, Chemie u. Physiologie der Farbstoffe, Kohlenhydrate und Proteinsubstanzen, S. 144, Leipzig 1877.

³⁾ B. Tollens, Handbuch der Kohlenhydrate. Bd. I. Breslau 1888, S. 239 ff.

⁴⁾ Ebermayer, Physiolog. Chemie der Pflanzen. Berlin 1882, S. 174.

einen Stoff zu gewinnen, welcher in seinem Procentgehalt an C und H, sowie durch die Löslichkeit in Kupferoxydammoniak und sein Verhalten gegen Jod und Schwefelsäure oder Chlorzinkjodlösung, mit der Cellulose unverholzter Zellmembranen übereinstimmt. Der Umstand, dass man die Cellulose durch Kupferoxydammoniak nicht einfach aus Holz in Lösung bringen kann, und dass die Blaufärbung durch die genannten Jodreagentien direkt nicht erzielbar ist, legte frühzeitig den Gedanken nahe, dass die Cellulose mit irgend einem oder mehreren Körpern im Holze verbunden ist.

Einen wesentlichen Fortschritt brachte die Entdeckung Hoppe-Seyler's,¹⁾ dass die Cellulose durch concentrirtes Kali bei Temperaturen von 150—200° C. zwar gänzlich intact bleibt, jedoch aus ihrer Bindung in der Holzsubstanz gelöst wird, so dass man von einer Verseifung einer ätherartigen Celluloseverbindung sprechen kann. Als den Paarling der Cellulose sieht Hoppe-Seyler eine Säure (»Ligninsäure«) an. G. Lange²⁾ stellte hierauf fest, dass man nach der von Hoppe-Seyler angegebenen Methode thatsächlich die gesamte Cellulose des Holzes gewinnt und eine quantitative Bestimmung hierauf gründen kann. Die Zahlen, welche man für den Cellulosegehalt des Holzes nach den verschiedenen Methoden (Weender Verfahren, Methode nach Fr. Schulze, Mitscherlich'sches Sulfitverfahren, W. Hoffmeister's Methode) gefunden hat, bewegen sich zwischen 50 und 62 % der Gesamttrockensubstanz des Holzes, so dass man annehmen darf, dass in der Regel die Cellulose wenig mehr als die Hälfte der Trockensubstanz beträgt.

Aus den Arbeiten von J. B. Lindsey und B. Tollens)³⁾ wissen wir, dass man thatsächlich aus der Holzcellulose (Sulfitcellulose) Traubenzucker gewinnen kann, womit die Identität

¹⁾ Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. XIII, S. 84 (1888).

²⁾ G. Lange, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XIV, S. 283 (1889).

³⁾ J. B. Lindsey u. B. Tollens, Annalen d. Chemie u. Pharm. Bd. 267, S. 370 (1891).

dieser Cellulose mit der allgemein verbreiteten Dextrosocellulose sichergestellt ist.

Die letztgenannten Autoren haben ferner die Gegenwart von Galactose und Mannose in der Sulfitlauge unzweifelhaft constatiren können.¹⁾ Es ist demnach der Schluss gerechtfertigt, dass im Einklange mit vielen anderen, vielleicht den allermeisten anderen Zellmembranen der höheren Pflanzen die Dextrosocellulose von Mannosocellulose und Galactan begleitet wird.²⁾ Quantitative Untersuchungen über diese Cellulosen des Holzes fehlen noch. Man wird jedoch mit der Wahrheit kaum im Widerspruche sein, wenn man die Menge dieser Holzbestandtheile als relativ gering einschätzt.

Nachdem schon seitens einiger älterer Autoren kurze Angaben über in Natronlauge lösliche Körper des Holzes publicirt worden waren, beschäftigte sich Th. Thomsen³⁾ in neuerer Zeit mit diesen Substanzen, und es gelang diesem Forscher, mit verdünnter Natronlauge aus den verschiedensten Holzarten 8—26 % Substanz in Lösung zu bringen, welche nach Fällung mit Alkohol ein wasserlösliches weisses Pulver von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$ darstellte. Ihr Entdecker nannte sie «Holzgummi». Fr. Koch⁴⁾ zeigte, dass man aus diesem Körper durch Hydrolyse eine noch nicht bekannte Zuckerart gewinnen könne. Die fragliche Substanz wurde hierauf von B. Tollens in Gemeinschaft mit H. J. Wheeler⁵⁾ und E. W. Allen⁶⁾ erschöpfend studirt und als das Derivat einer neuen Pentose (Xylose) erkannt, dementsprechend »Xylan«

1) Ueb. Holzsulfitflüssigkeit u. Lignin, l. c., S. 341 ff.

2) Vgl. E. Schulze, Landwirthsch. Jahrbücher, Bd. 21, S. 88 (1892) und die späteren Arbeiten dieses Forschers in der Zeitschrift für physiolog. Chemie und den landwirthsch. Jahrbüchern.

3) Th. Thomsen, Journal f. prakt. Chemie. N. F., Bd. XIX, S. 146—168.

4) Fr. Koch, Pharm. Zeitschr. f. Russland, Bd. 25 (1886); Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 20, Ref. 145; Just's botan. Jahresbericht, 1886 I. 239, II. 290.

5) H. J. Wheeler u. B. Tollens, Annal. d. Chemie, Bd. 254, S. 304 (1889).

6) E. W. Allen u. B. Tollens, ibid. Bd. 260, S. 289 (1890).

benannt. Der Xylangehalt ist bei den verschiedenen Baumarten different, und es sei nur bemerkt, dass das Coniferenholz auffallend wenig Xylan enthält. Die Draggendorff'sche Schule¹⁾ unterschied die mit 1%iger Kalilauge extrahirbare Substanz als «Metaarabinsäure» vom Holzgummi; wahrscheinlich sind aber die Körper identisch.

Nachdem es sich beim Xylan um einen wasserlöslichen Körper handelt und dasselbe mit Wasser dem Holze nicht entzogen werden kann, liegt es nahe, auf eine ätherartige Bindung mit anderen Holzsubstanzen zu schliessen. Es ist auch angegeben worden, dass vorherige Behandlung mit Salzsäure es gestattet, aus allen Hölzern auch mit 1%iger Natronlauge viel grössere Substanzmengen zu extrahiren, als nach dem Thomsen'schen Verfahren, wobei vorher nur mit Ammoniak ausgewaschen wird. (W. Hoffmeister.)²⁾ Da des Weiteren behauptet wird, dass unter solchen Bedingungen selbst Coniferenholz ansehnliche Mengen natronlöslicher Substanz liefert, so muss man die Frage ventiliren, ob die beiden Methoden nicht differente Produkte liefern, und es wäre eine Nachuntersuchung der Angaben Hoffmeister's wünschenswerth.

Was wir bezüglich der übrigen Bestandtheile des Holzes wissen, ist äusserst wenig, wenngleich einige interessante Angaben vorliegen, welche Derivate eines offenkundigen Hauptbestandtheiles des Holzes betreffen. In der bereits citirten Arbeit beschäftigt sich G. Lange mit den Spaltungsprodukten des vom Xylan befreiten Holzes nach Erhitzen auf 185° mit concentrirtem Kaliumhydroxyd. Nach Aufnahme der alkalischen Schmelze mit Wasser, Abstumpfen bis zur eben noch alkalischen Reaction und Abfiltriren des Celluloseniederschlages konnte durch Ansäuern des Filtrates ein Körper von Säurecharakter ausgefällt werden, welcher trocken ein leichtes hellbraunes amorphes Pulver darstellt und stickstofffrei ist. Lange unterscheidet

¹⁾ Draggendorff, Analyse v. Pflanzen. Göttingen, 1882, S. 87, 90, 93; ferner N. Schuppe, Beiträge z. Chemie des Holzgewebes, Dissert., Dorpat, 1882. u. a. Dissertationen aus Draggendorff's Laboratorium; vgl. ferner A. Wieler, Landwirthsch. Versuchsstation, Bd. 32, S. 342 (1888).

²⁾ W. Hoffmeister, Landwirthsch. Jahrbücher, Bd. 17, S. 259 (1888).

zwei einander offenbar sehr nahestehende derartige «Ligninsäuren». Ihre Eigenschaften waren aber zu einer genauen Charakterisirung noch nicht hinreichend definirt. Als weitere Produkte der Spaltung wurden erhalten Essigsäure, Ameisensäure, Oxalsäure, Brenzkatechin und Protokatechusäure. Die Untersuchung von Holz der Buche, Eiche und Tanne ergab äusserst ähnliche Resultate, es bezifferte sich die Menge der erhaltenen «Ligninsäuren» auf 12—14% der Holzsubstanz.

Ein anderes, höchst wahrscheinlich als Sulfonsäuren der fraglichen Holzsubstanzen anzusprechendes Produkt erhielten Lindsey und Tollens in ihrer gleichfalls schon erwähnten Arbeit als Bleiessigfällung aus der Holzsulfitflüssigkeit. Die aus dem zerlegten Bleiniederschlag gewonnene Substanz war durch Alkohol fällbar, amorph, enthielt 2,5% Asche und entsprach der Zusammensetzung $C_{26}H_{30}SO_{11}$. Die Verfasser nehmen darin zwei Methylgruppen an. Der Körper bildet die Hauptmasse der in der Sulfitlauge gelösten Substanzen. Da man es nach diesen Befunden offenbar noch mit Gemengen differenter Körper zu thun hat, so lässt sich über die Natur dieser Bestandtheile des Holzes bis jetzt kein Urtheil abgeben. Sicher steht heute somit nur das Vorkommen von Hexosanen und Pentosanen in der verholzten Membran.

Manche Befunde bei der Holzanalyse sind auf aromatische Körper als Holzbestandtheile bezogen worden. So fiel vielen Beobachtern der Geruch bestimmter Fractionen nach Vanillin auf (Singer,¹⁾ Hoffmeister,²⁾ Nickel,³⁾ Allen-Tollens,⁴⁾ Lindsey-Tollens).⁵⁾

Es haben ferner Tiemann und Haarmann auf Grund der grünen Farbenreaction mit Phenolsalzsäure die Gegenwart

1) M. Singer, Beiträge z. näh. Kenntn. d. Holzsubstanz. Sitzungsbericht d. Wiener Akad., Bd. 85, I. Abth., Maiheft, 1882.

2) W. Hoffmeister, Landwirthsch. Jahrbücher, Bd. 17, S. 260, 1888.

3) E. Nickel, Botan. Centralbl., Bd. 38, S. 754, 1889.

4) E. W. Allen u. B. Tollens, Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 260, S. 304, 1890.

5) J. B. Lindsey u. B. Tollens, Annal. d. Chem., Bd. 267, S. 341, 1891.

Ferner ein Anonymus in Dingler's polytechn. Journal, Bd. 216, S. 372.

von Coniferin im Holze behauptet. Ich werde auf diese Befunde bei der Deutung der «Ligninreactionen» zurückkommen. Hier möchte ich nur constatiren, dass es bisher noch Niemandem zweifellos gelungen ist, ein Benzolderivat aus Holz zu isoliren, und dass die angeführten qualitativen Merkmale trotz mancher anscheinend dafür sprechenden Momente die Meinung der betreffenden Autoren nicht ausreichend begründen. Der Beachtung sei ferner empfohlen, dass die Versuche Hoppe-Seyler's und Lange's erwiesen haben, dass man aus Holz durch Erhitzen mit concentrirtem Alkali auf 185° Brenzkatechin und Protokatechusäure darstellen kann, wobei nach Hoppe-Seyler die Cellulose intact bleibt. Bei Temperaturen über 200° wird, wie der genannte Forscher gegenüber anders lautenden Angaben nachwies, allerdings aus Cellulose durch Alkalien Protokatechusäure und wenig Pyrokatechin gebildet. Hinzuweisen bleibt nur auf die Möglichkeit, dass andere Kohlenhydrate oder verwandte Körper des Holzes schon bei 185° die genannten Benzol-derivate bei Alkalieinwirkung entstehen lassen könnten, wodurch wieder die Beweiskraft der Lange'schen Versuche für die Gegenwart aromatischer Körper im Holze geschmälert wird.

Die „Ligninreactionen“ und deren Bedeutung.

Zunächst eine kurze Uebersicht dieser sehr bekannten Reactionen: Die Holzsubstanz färbt sich mit der wässerigen oder alkoholischen Lösung vieler Phenole bei Gegenwart concentrirter Salzsäure intensiv, und zwar mit:

Phenol blaugrün (Runge,¹⁾ Tiemann-Haarmann),²⁾
Phloroglucin violettroth (Wiesner),³⁾
Resorcin violett (Wiesner),
Orcin rothviolett (Lippmann),⁴⁾
Brenzkatechin grünlichblau (Wiesner),

1) Runge, Poggendorfs Annalen, Bd. 31, S. 65, 1834.

2) Tiemann u. Haarmann, Chem. Berichte, Bd. 7, S. 608, 1874.

3) J. Wiesner, Ueber das Verhalten des Phloroglucins u. einiger verwandter Körper zu verholzten Zellmembranen. Sitzungsber. d. Wiener Akad., Bd. 77 I, S. 60—66, 1878.

4) Cit. bei Wiesner.

Pyrogallol blaugrün (Wiesner, Ihl),¹⁾

Guajakol gelbgrün,

Kresol grünlich,

α -Naphthol grünlich (Ihl),

Thymol grün,

Anisol grünlichgelb,

Anethol grünlichgelb,

Indol kirschroth (v. Baeyer, Niggel),²⁾

Skatol kirschroth (Mattiolo),³⁾

Carbazol kirschroth (Mattiolo),

Pyrrol roth.

Zusatz von Kaliumchlorat verstärkt öfters (Tommasi,⁴⁾ Molisch).⁵⁾

Eine zweite Reihe von «Ligninreactionen» bildet die Gelbfärbung mit einer Anzahl aromatischer Amine in neutraler oder angesäuerter Lösung, eine gleichfalls zum Theil schon in älterer Zeit beobachtete Erscheinung. Von solchen Substanzen sind zu nennen: die Salze des Anilins (Runge,⁶⁾ Schapringer,⁷⁾ Wiesner,⁸⁾ v. Höhnel⁹⁾, Paratoluidin (Singer),¹⁰⁾ Xylidin, Metaphenyldiamin (Molisch),¹¹⁾ Dimethylparaphenyldiamin (Wurster,¹²⁾ Rothfärbung), α - und β -Naphthylamin

1) A. Ihl, Chemikerzeitg. 1885, S. 266.

2) Niggel, Flora 1881, S. 545, daselbst cit. v. Baeyer, Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 140.

3) O. Mattiolo, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. 2, S. 354, 1885.

4) J. u. T. Tommasi, Chem. Ber. 1881, S. 1834.

5) H. Molisch, Berichte d. deutsch. botan. Gesellsch., Bd. 4, Heft 7, 1886.

6) Runge, l. c. 1834.

7) Schapringer, Wochenschr. d. niederösterreich. Gewerbevereins, Bd. 26, S. 326. Dingler's polytechn. Journal 1865, Bd. 176, S. 166.

8) J. Wiesner, Karsten's botan. Untersuchungen, Bd. 1, S. 120, 1866.

9) F. v. Höhnel, Sitzungsber. d. Wiener Akad., Bd. 76 I, S. 527.

10) M. Singer, ibid. Bd. 85 I, S. 358, 1883.

11) H. Molisch, Verhandl. d. zoolog. botan. Gesellsch. in Wien, 1887, S. 30.

12) Wurster, Chem. Berichte, 1887, S. 808.

(Nickel)¹⁾ und Andere. Von Hegler²⁾ wurde die Gelbfärbung mit Thallinsulfat aufgefunden.

So sehr in der botanischen Litteratur das Aufsuchen neuer «Holzstoffreagentien» beliebt war, so wenig sicher ist die Deutung der Reactionen. Die Ursache liegt darin, dass es den meisten Autoren nur um die Eruirung brauchbarer mikrochemischer Reactionen ankam. Aber auch die wenigen Arbeiten, die über dieses Ziel hinausgingen, sind methodisch unzureichend und führten zu unsicher begründeten Resultaten.

Die erste Vermuthung bezüglich der Natur der Ligninreactionen findet sich wohl in Tiemann-Haarmann's³⁾ Coniferinarbeit ausgesprochen, woselbst aus der Aehnlichkeit der Runge'schen Fichtenspanreaction und der Reaction des Coniferins auf Phenol-HCl auf einen Coniferingehalt der lignificirten Membran geschlossen wird. Dieser Gedanke wurde von E. Tangl⁴⁾ und F. v. Höhnel⁵⁾ acceptirt, jedoch nicht tiefer begründet. Eine durchaus kritiklose Arbeit R. Müller's⁶⁾ verdient keine Erwähnung. Ein Versuch, den fraglichen Körper aus dem Holze zu isoliren, ist bisher nicht gelungen. In der citirten Arbeit v. Höhnel's findet man auch kritische Angaben über die recht verworrenen Ansichten der älteren Botaniker bezüglich der durch concentrirte Säuren erzeugten Färbungen am Holzkörper mikroskopischer Schnitte.

Ein weiterer Versuch, die wirksame Substanz im Holze zu suchen, ging von M. Singer⁷⁾ aus, welcher in seiner unter Wiesner's Leitung ausgeführten Arbeit angab, er hätte neben der Gegenwart von Coniferin die Ursache der Ligninreactionen

1) E. Nickel, Die Farbenreactionen der Kohlenstoffverbindungen 2. Aufl. Berlin 1890, S. 51.

2) R. Hegler, Flora 1890, S. 33. Botan. Centralbl., B. 38, S. 616, 1889. Dasselbst wird auch Toluylendiamin angegeben.

3) F. Tiemann und W. Haarmann, Chem. Berichte, Bd. 7 S. 608, 1874.

4) E. Tangl, Flora, 1874, S. 239.

5) G. v. Höhnel, Histochem. Untersuchungen üb. d. Xylophilin u. Coniferin. Wiener Akademieberichte, Bd. 76 I, S. 663, 1877.

6) R. Müller, Flora, 1874, S. 399.

7) M. Singer, Wiener Akademieberichte, Bd. 85 I, S. 346, 1882.

in einem Vanillingehalte des Holzes nachgewiesen. Singer kochte Coniferenholz längere Zeit mit Wasser aus und fand, dass das eingedampfte Extract vanilleartig roch, sich mit Phloroglucinreagens roth, mit Anilinsulfat gelb färbte, woraus er auf Vanillin schloss. Es liegt auf der Hand, dass dieser Schluss unberechtigt ist, so lange nicht die reine Substanz vorliegt. Uebrigens ist es sehr zweifelhaft, ob Singer nicht bereits Zersetzungsprodukte der gesuchten Substanz in Händen hatte, nachdem monatelanges Kochen in gewöhnlichen Glaskolben wohl gleichbedeutend ist mit der Einwirkung von Alkalien auf Holz. Bezüglich der Coniferenfrage berichtet Singer nichts Neues. Die Auffassung des genannten Autors ist übrigens bis in die neueste botanische und chemische Litteratur fast unverändert übergegangen.

Auch die Arbeiten A. Ihl's¹⁾ welcher als Ursache der Ligninreactionen Zimmtaldehyd und kleine Mengen von Eugenol, Safrol und Anethol verantwortlich machte, stehen auf keiner besseren Basis als die Theorie Singer's. Alles dies wurde vollkommen zutreffend in mehreren Publicationen von E. Nickel²⁾ kritisiert, weswegen nicht mehr darauf eingegangen werden muss. Ziemlich conform mit Nickel's Ansichten äusserte sich Th. Seliwanoff³⁾ über die Grundlage der Holzstoffreactionen. Beide Autoren lehnen der unleugbaren Differenzen wegen, welche die Farbennuancen und Empfindlichkeit der Phloroglucinprobe und Anilinprobe bei Holz und Vanillin zeigen, die Singer'sche Ansicht ab. Sie nehmen aber auf Grund einiger Aldehydreactionen, welche das Holz gibt, nicht mit Unrecht an, dass derlei Substanzen vorliegen dürften, wobei die nähere Eruirung derselben offen gelassen wird. Hervor-

¹⁾ A. Ihl, Chemikerztg. 1889, Bd. 13, S. 432, 560, 1891, S. 201.

²⁾ E. Nickel, Chemikerztg. 1887, S. 1520; Botan. Centralblatt Bd. 38, S. 753, 1889. Farbenreactionen der Kohlenstoffverbindung, 1890, S. 32 ff.

³⁾ Th. Seliwanow, Ueb. Holzstoff u. seine Reactionen. Arbeiten d. St. Petersburger Naturforscherges. V. Abth. d. Botan. XX, 1889, S. 20 ff. (russisch), Referat v. Rothert im Botan. Centralbl. Bd. 45, S. 279, 1891.

zuheben ist, dass Holz die Schiff'sche Reaction mit Fuchsin-schwefliger Säure sehr prägnant zeigt, dass ferner nach Nickel mit Natriumbisulfit getränktes Holz, nach Seliwanoff mit Hydroxylamin imprägnirtes Holz die Anilinreaction nicht gibt. Allerdings ist die letztere Thatsache kein direkter Beweis, dass gerade die chromogene Substanz im Holze ein Aldehyd ist, indem ja die Hemmung der Reaction durch eine dritte Verbindung im Holze geschehen könnte.

Immerhin hält man jetzt wohl allgemein daran fest, dass irgend welche aromatische Aldehyde die Ligninreactionen verursachen, und es ist vielleicht angezeigt, diese Anschauung kritisch zu beleuchten und besonders im Hinblick auf die Phloroglucinprobe an einem Beispiele zahlreicher verwandter Körper zu demonstrieren, dass man aus dieser Ligninreaction allein nicht auf einen Aldehyd schliessen darf und dass ferner keine bestimmte Atomgruppe durch diese Farbenreaction angedeutet wird.

Wir sehen positiven Ausfall der rothen Phloroglucinreaction bei Phenolen (Eugenol, Safrol, Anethol), ob substituiert oder nicht; bei Alkoholen (Styron, Coniferylalkohol, Syringenin), Aldehydoalkoholen, Aldehyden und Säuren (Kaffeesäure, Ferulasäure).¹⁾ Der Farbenton ist allerdings oft abweichend von der Ligninnuance, jedoch häufig vollkommen identisch (Safrol, Coniferylalkohol, Aldehydoconiferylalkohol, Syringenin, Ferulasäure). Dass keine bestimmte Atomgruppe eine Rolle bei dem Reactionsausfalle spielt, ist durch einen Blick auf die beistehende Tabelle sofort ersichtlich. Bezüglich der gelben Reaction mit Anilinsulfat kommt man zu ganz ähnlichen Erfahrungen. Nach den Farbenreactionen allein ist es demnach ganz unmöglich, sich eine bestimmte Vorstellung über die Ursache der Holzreactionen zu bilden, und ich brauche das vielfach beliebte kritiklose Anwenden dieser Reactionen in der mikroskopisch-botanischen Praxis nicht erst zu verurtheilen und will einfach

¹⁾ Bereitet aus *Asa foetida*. Dieses Gummiharz gibt in seinem alkoholischen Extract eine intensive rothviolette Reaction mit Phloroglucin-Salzsäure, was meines Wissens in den pharmakognostischen Werken noch nicht erwähnt wurde.

Phloroglucinprobe.

Verbindung.

Brenzkatechin	(1, 2) $(OH)_6 \cdot C_6H_4$	negativ.
Guajakol	(1) OH (2) $OCH_3 \cdot C_6H_4$	„
Anethol	(1) OCH_3 (4) $CH : CH \cdot CH_3 \cdot C_6H_4$	roth.
Eugenol	(1) $CH_3 \cdot CH : CH_2$ (3) OCH_3 (4) $OH \cdot C_6H_3$	kirschroth.
Chavibetol	(1) $CH_3 \cdot CH : CH_2$ (3) OH (4) $OCH_3 \cdot C_6H_3$	„
Safrol	(1) $CH_3 \cdot CH : CH_2$ (3, 4) $O_2CH_3 \cdot C_6H_3$	roth, genau wie bei Holz.
Vanillylalkohol	(1) CH_2OH (3) OCH_3 (4) $OH \cdot C_6H_3$	negativ.
Vanillin	(1) COH (3) OCH_3 (4) $OH \cdot C_6H_3$	morgenroth.
Protokatechualdehyd	(1) COH (3, 4) $(OH)_2 \cdot C_6H_3$	„
Isovanillin	(1) COH (3) OH (4) $OCH_3 \cdot C_6H_3$	„
Piperonal	(1) COH (3, 4) $O_2CH_2 \cdot C_6H_3$	„
Protokatechonsäure	(1) COOH (3, 4) $(OH)_4 \cdot C_6H_3$	negativ.
Zimmtalkohol	(1) $CH : CH \cdot CH_2OH \cdot C_6H_3$	gelbroth.
Zimmtaldehyd	(1) $CH : CH \cdot COH \cdot C_6H_3$	dunkelroth.
Zimmtsäure	(1) $CH : CH \cdot COOH \cdot C_6H_3$	negativ.
Kaffeesäure	(1) $CH : CH \cdot COOH$ (3, 4) $(OH)_2 \cdot C_6H_3$	blauroth.
Coniferylalkohol	(1) $CH : CH \cdot CH_2OH$ (3) OCH_3 (4) $OH \cdot C_6H_3$	roth, wie bei Holz.
Ferulasäure	(1) $CH : CH \cdot COOH$ (3) OCH_3 (4) $OH \cdot C_6H_3$	„ „ „
Aldehydoniferylalkohol	(1) $CH : CH \cdot CH_2OH$ (3) OCH_3 (4) OH (5) $COH \cdot C_6H_3$	„ „ „
nach der Reimer'schen Synthese aus Coniferyl- alkohol dargestellt		
Cubebin	(1) $CH : CH \cdot CH_2OH$ (3, 4) $O_2CH_2 \cdot C_6H_3$	negativ.
Syringenin	(1) $CH : CH \cdot CH_2OH$ (3, 4) $(OCH_3)_2$ (5) $OH \cdot C_6H_3$	roth, wie bei Holz.
Hesperitinsäure	(1) $CH : CH \cdot COOH$ (3) OH (4) $OCH_3 \cdot C_6H_3$	negativ.

hervorheben, dass ein Erkennen der im Holze vorkommenden Substanzen damit nicht ermöglicht wird. Man käme im Weiteren sonst auch dazu die *Asa foetida* als «verholzt» anzusehen.

Da man auch die Angaben Nickel's und Seliwanoff's, wie oben bemerkt, nicht als direkten Beweis für die Aldehydnatur der Farbenreactionen gebenden Holzsubstanz ansehen muss, so ist thatsächlich nach den heute vorliegenden That-sachen die Frage noch offen zu nennen.

Eine Reihe weiterer Forscher begnügte sich, ohne sich über die Natur der gesuchten Substanz weiter auszusprechen, damit, an die vorliegenden Meinungen einen kritischen Massstab zu legen, und warf den Gedanken auf, ob nicht mindestens ein Theil der erwähnten Farbenreactionen auf die Einwirkung der concentrirten Salzsäure auf eines der bekannten Kohlenhydrate des Holzes zu beziehen, somit als Furfurolreactionen aufzufassen sei. In diesem Sinne sind wohl die Auseinandersetzungen Udranszky's¹⁾ zu verstehen, welcher besonders die Beweiskraft der Fichtenspanreaction für Gegenwart von Phenol im Sinne Tommasi's anzweifelte. Mit gebührender Vorsicht deuten ferner Allen und Tollens²⁾ die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen Holzgummi und Ligninreactionen an. Auch Reinitzer³⁾ scheint zu dieser oder einer verwandten Ansicht hinzuneigen. Allen und Tollens haben jedoch gleichzeitig auch darauf hingewiesen, dass in der Kälte, wie es beim Holze der Fall ist, keine Pentose oder Pentosan die Phloroglucinprobe gibt, sondern alle erst beim Erwärmen, worin ein durchgreifender Unterschied besteht. Zu bemerken ist auch, dass der Salzsäuregehalt des Reagens, welcher zur Erzeugung der Färbung nöthig ist, nach meinen Erfahrungen bei der Pentosenreaction grösser sein muss, als bei der Ligninreaction.

1) L. v. Udranszky, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XII, S. 367, 1888.

2) Annalen d. Chem., Bd. 260, S. 289 ff., 1890.

3) F. Reinitzer, Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XIV, S. 466, 1890. Vgl. ferner Cross-Bevan, Journ. Chem. Soc., 55, S. 213, 1889; Chem. News 64, S. 63. Van Ketel, Referat im Botan. Centralbl. Beiheft, 1897, S. 423.

Besonders tritt diese Differenz beim Coniferin hervor, welches mit dem Tollens'schen Pentosenreagens (gesättigte Lösung von Phloroglucin in einem Gemische gleicher Theile Wasser und HNO_3 -freier Salzsäure von 1,19 specifischem Gewicht) direkt eine rothviolette Färbung in der Kälte gibt (infolge der HCl -Wirkung, die für sich allein schon Blaufärbung erzeugt), während mit einer HCl -Menge, die an Holz kräftige Rothfärbung hervorruft, im Vereine mit Phloroglucin noch keine Reaction zu erzielen ist.¹⁾

Thatsächliche Ergebnisse hat somit auch diese Deutung der Ligninreactionen nicht ergeben.

Die bisherigen Versuche, den Träger der Ligninreactionen aus Holz zu isoliren.

Singer's erwähnte, wenig erfolgreiche Bemühungen, die chromogene Substanz durch lange andauerndes Kochen mit Wasser vom Holze zu trennen, sind wohl die ersten Versuche in dieser Hinsicht zu nennen. Jedoch auch die wenigen Berichte aus späterer Zeit haben wenige Resultate bekannt gemacht.

W. Hoffmeister²⁾ fand, dass man nach wiederholter abwechselnder Behandlung des Holzes mit kalter concentrirter Salzsäure und Kupferoxydammoniak (oder 5%iger Natronlauge) schliesslich einen Rest der Holzsubstanz erhält, welcher noch immer intensive Ligninreactionen gibt. Dabei roch das alkalische Extract stark nach Vanille. Ich kann hinzusetzen, dass dasselbe auch deutliche Ligninreactionen gibt, aber nicht so intensiv, als dass eine Gewinnung der Substanz aus dem Extract aussichtsvoll wäre. In der That misslangen Hoffmeister's dahin gerichtete Versuche und ich selbst hatte keinen besseren Erfolg.

Th. Seliwanoff³⁾ berichtet, es sei ihm gelungen, durch Auskochen von Kiefernholz mit Calciumbisulfit als Hauptprodukte Cellulose und einen «gummiartigen Klebstoff» zu erhalten.

1) Vgl. N. J. Wheeler u. B. Tollens, Annal. d. Chemie, Bd. 254, S. 331.

2) Landwirthsch. Jahrbücher, Bd. 17, S. 260.

3) Referirt im Botan. Centralbl., 45, S. 279, 1891.

Letzterer gab mit Phloroglucin-Salzsäure beim Erwärmen eine ähnliche Reaction wie Holz. Da mit diesem «Gummi» augenscheinlich in der Kälte keine Ligninreaction zu erzielen war, so ist kaum anzunehmen, dass Seliwanoff die fragliche Substanz unverändert in Händen hatte, sondern es dürfte sich um ein pentosenhaltiges Extract gehandelt haben. Nach meinen Erfahrungen gibt ein heissbereitetes Sulfitextract aus Holz die Ligninreaction nicht und die fragliche Substanz ist gewiss weiter verändert.

Nach den Aeusserungen E. Nickel's¹⁾ ist es diesem Autor ebenfalls nicht gelungen, die gesuchte Substanz darzustellen. Ebenso gelangten E. W. Allen und B. Tollens²⁾ zu keinem Resultate.

A. Ihl³⁾ will aus Holz durch Kochen mit Alkali oder Säure, besonders unter Druck, ein «Gummiharz» abgespalten haben, als gelbbraune, durchsichtige, spröde Masse, in Alkalien löslich, durch Kalkhydrat fällbar, das er «Lignin» nennt, und welches die Holzreactionen gibt. Die vorhandenen Angaben lassen noch kein Urtheil über die Richtigkeit der Ansichten Ihl's zu. Jedenfalls hatte dieser Forscher ebenfalls keinen reinen Körper in Händen.

Lindsey und Tollens⁴⁾ suchten endlich in der Sulfitflüssigkeit nach den in Rede stehenden Verbindungen. Das mit Schwefelsäure hydrolysirte Alkoholextract der Sulfitlauge roch stark vanilleähnlich, gab auch genau dieselbe rothe Farbenance mit dem Phloroglucinreagens wie Vanillin. Krystalle konnten jedoch nicht abgeschieden werden.

Eine neue Darstellungsmethode.

Bei den umfassenden Vorversuchen zur Ermittlung der Natur unserer Substanz, wobei u. A. auch der Einfluss ver-

1) E. Nickel, Botan. Centralbl., Bd. 38, S. 754, 1889.

2) E. W. Allen und B. Tollens, Annalen der Chemie, Bd. 260, S. 304, 1890.

3) A. Ihl, Chemikerzeitung, 1891, S. 201—202.

4) J. B. Lindsey und B. Tollens, Annalen der Chemie, Bd. 267, S. 341 ff., 1891.

schiedener Reductionsmittel auf Holz systematisch untersucht wurde, stellte es sich heraus, dass man durch einige Substanzen das Substrat der «Ligninreactionen» aus dem Holze reichlich in Lösung bringen kann.

Kocht man Holzfeilspähne einige Minuten mit starker Zinnchlorürlösung und versucht nach Erkalten der Probe die Phloroglucinreaction, so ist zu beobachten, dass nicht allein das Holz sich roth färbt, sondern auch die darüber stehende Flüssigkeit roth wird. Schüttelt man die mit Zinnchlorür behandelte Probe erst mit Aether oder Benzol aus und untersucht dann das Extractionsmittel, so ist an der intensiven Phloroglucinreaction zu erkennen, dass die chromogene Substanz durch Zinnchlorür abgespalten wurde und sich nun mit Benzol, Aether und anderen Mitteln extrahiren lässt.

Kalte, gesättigte Natriumbisulfitlösung wirkt ähnlich, jedoch schwächer als kochende Zinnchlorürlösung. Heisse Bisulfitlösung zerstört aber die Substanz ziemlich rasch.

Diese Versuche bilden den Ausgangspunkt meiner Darstellungsmethode.

Einige Zeit nach Feststellung dieser Thatsachen fand ich auch, dass man aus jeder Holzart direkt, ohne vorhergehende Aufspaltung, mittelst kochenden Alkohols, Benzols, Aethers ein Extract gewinnen kann, welches die Ligninreactionen mehr oder weniger stark gibt. Es genügt, Feilspäne irgend einer Holzart 2—3 Minuten lang mit Alkohol zu kochen. Der filtrirte Alkohol gibt die Rothfärbung mit dem Phloroglucinreagens sehr deutlich. Alle Holzarten verhalten sich nicht ganz gleich. Von den vielen untersuchten Species geben aber die meisten eine gleichmässig schwache Ligninreaction in ihrem Benzol- oder Alkoholextract. Sehr stark gelingt die Probe beim Holze von *Acacia armata* R. Br. In der Regel ist aber die Reaction bedeutend weniger stark als nach vorhergehender, einige Minuten andauernder Behandlung mit kochender Zinnchlorürlösung. Ich dachte anfänglich, dass die direkte Alkoholextraction des Holzes zur Darstellung des gesuchten Körpers die grössten Chancen böte. Diese Erwartungen wurden aber nicht erfüllt. Ich erhielt wohl nach längerem Stehen von Ligroinextract aus dem rohen Al-

koholauszug wenige Krystalle, die sich mit dem Ligninreagens roth färbten, war aber nicht im Stande, die geringe Menge derselben von dem einhüllenden gelbbraunen Syrup zu trennen, und musste endlich die Versuche abbrechen. Es blieb also nur das ergibigste Verfahren übrig, das Holz mit kochender Zinnchlorürlösung zu behandeln und hierauf die Substanz zu extrahiren.

Zur Verarbeitung grösserer Holzmengen ging ich folgendermassen vor.

Möglichst fein gefeilt, durch ein feines Sieb von allen grösseren Partikeln gesondertes, gut ausgewaschenes Holzpulver wurde mit dem 6—8fachen Gewichte an Wasser zu einem mässig dünnen Brei angerührt und in gut emailirtem Geschirr auf dem Wasserbade erhitzt. Hierauf wurde allmählich unter stetem Umrühren festes Zinnchlorür eingetragen und der Holzbrei unter möglichst häufigem Rühren am Vor- und Nachmittage 3—4 Stunden lang gekocht. Zinnchlorür wurde bis zur Gewichtsmenge des Holzes eingetragen, und zwar so, dass der Holzbrei nach Eintragung des gesammten Zinnchlorürs noch etwa 2 Stunden lang kochte. Während des Zerlegungsprocesses wird fortwährend kontrollirt, wie stark das Benzolextract aus dem Holzbrei die Phloroglucinprobe gibt. Schon nach 1 Stunde ist sie deutlich; gegen Ende des Processes gibt eine Holzprobe mit Benzol extrahirt eine sehr intensive blaurothe Reaction. Während des Processes nimmt der Holzbrei allmählich eine röthlichgelbe bis fleischrothe Farbe an, riecht angenehm obstartig; darüber gehaltenes Anilinacetatpapier färbt sich lebhaft roth. Eine dritte, 3stündige Erhitzung kann unbeschadet geschehen, vermehrt aber in der Regel nicht mehr die Reaction des Benzolextractes. Das Holz darf nur keine braune Farbe annehmen.

Sobald die Spaltung mit Zinnchlorür beendet ist, lässt man den Holzbrei etwas auskühlen und überträgt den noch warmen Brei in ein grosses weithalsiges Glasgefäss, woselbst es mit dem gleichen Volumen Benzol versetzt wird. Man schüttelt in der Kälte gut aus, lässt 24 Stunden stehen und filtrirt das Benzol ab. Die Procedur wird noch 2—3 mal mit der gleichen

Benzolmenge vorgenommen. Das Benzol wird nun im Vacuum aus einem Fractionirkölbchen abdestillirt, in dessen Hals man vortheilhaft einen Scheidetrichter zum Nachgiessen des Benzols anbringt. Sobald eine gewisse Concentration erreicht ist, scheiden sich aus dem Extract Krystalle aus, welche nicht der gesuchten Substanz angehören, sondern die Zinnverbindung eines anderen Körpers darstellen.¹⁾ Wenn das Extract nur mehr 20—30 ccm. beträgt, wird die Destillation abgestellt. Man filtrirt nun die grünlichgelbe, angenehm riechende Flüssigkeit und versetzt das Filtrat mit der gleichen Menge Ligroin. Es fallen nach wenigen Augenblicken weisse, gut abfiltrirbare Flocken aus, welche den Rest der erwähnten Zinnverbindung darstellen. Man dunstet nun in einem Becherglase das Filtrat von diesem Niederschlage ein und nimmt den Rückstand mit siedendem Ligroin auf. Die gesuchte Substanz ist in heissem Ligroin löslich. Das Ligroin wird kochend heiss filtrirt. Nach dem Erkalten scheidet sich ein grosser Theil der Substanz meistens in körnigen, braunen, undeutlich krystallinischen Krusten aus. Dieses Rohprodukt war durch Umkrystallisiren und Lösen und Fällen mit verschiedenen Mitteln absolut nicht zu reinigen. Offenbar sind hier Verunreinigungen durch Furfurolverbindungen die Ursache, eine Complication, deren Bedeutung schon Schiff²⁾ bei der Darstellung von Salicylaldehyd erfuhr. Auch in unserem Falle verräth sich die Gegenwart solcher Beimengungen durch die intensive Röthung, welche das ursprünglich blanke, grüngelbe, concentrirte Benzolextract binnen weniger Stunden an der Luft erfährt, nachdem die Vacuumdestillation beendet ist.

Nachdem es sich bei der vorläufigen qualitativen Prüfung des Rohextractes herausgestellt hatte, dass die gesuchte Substanz eine Natriumbisulfidverbindung eingeht, so war ein weiterer

1) Der Körper ist aus Alkohol gut krystallisirbar und leicht zu reinigen. Die Untersuchung ergab, dass er das Zinnsalz einer organischen Säure ist. Durch Zerlegen mit Schwefelwasserstoff gewinnt man die freie Säure. Dieselbe gibt eine unlösliche Silberverbindung. Letztere hat nicht die Eigenschaften des lävulinsäuren Silbers.

2) Schiff, *Annalen der Chemie*, Bd. 210, S. 115, Anmerkung, 1881.

Schritt zur Reinigung des Körpers möglich. Das eingedunstete Lignoextract wurde mit Aether aufgenommen und die ätherische Lösung genau nach Tiemann's¹⁾ Vorgang bei der quantitativen Vanillinbestimmung mit Natriumbisulfit ausgeschüttelt und mit verdünnter Schwefelsäure die Natriumbisulfitverbindung zerlegt. Die Substanz geht erst nach lange andauerndem Schütteln und oftmaliger Extraction annähernd vollständig aus dem Aether in die Bisulfitlösung, nicht so leicht, wie es Tiemann und Haarmann für das Vanillin fanden. Die Natriumbisulfitverbindung ist, wie jene des Vanillins, in Wasser leicht löslich. Die nach Zerlegung der Bisulfitverbindung mit Aether aufgenommene Substanz ist nun beträchtlich reiner als vor der Operation. Nach Eindunsten der Aetherlösung wurde der Körper mit kochendem Lignoextract gelöst, der nach allmählichem Erkalten ausgefallene Niederschlag nochmals aus Lignoextract umkrystallisiert.

Ich erhielt auf diese Weise ein hellgelblich braunes krystallinisches Pulver, welches die Ligninreactionen äusserst intensiv in denselben Nuancen gab, wie das Holz. Die Ausbeute war leider nur sehr klein. Bei sehr sorgfältigem Arbeiten erhält man aus 1 kg. Holz nur 2 gr. rohes Lignoextract, welches nach den Reinigungsprocessen eine sehr geringe Substanzmenge liefert.

Die Extraction des Körpers geht zwar langsam von Statten, doch kann man nach der einmaligen 6stündigen Behandlung des Holzpulvers mit Zinnchlorür mittelst des Mikroskopes an einer gut ausgewaschenen Holzprobe sicher stellen, dass sich die allermeisten Bruchstücke der Holzzellen und Gefässe mit Phloroglucin-Salzsäure nicht mehr färben, während untermischt mit solchen gänzlich extrahirten noch lebhaft rothe (besonders an den Rändern gefärbte) Partikel sich befinden. Es liegt somit an der möglichst feinen Zerkleinerung des Materials, sowie an dem steten Umrühren während der Spaltung mit Zinnchlorür, wenn man möglichst vollständig den gesuchten Körper aus dem Holze gewinnen will.

¹⁾ F. Tiemann u. W. Haarmann, Berichte d. deutsch. chem. Ges. Bd. 8, S. 1118--20. 1875.

Der Process geht mit allen Holzarten gleich gut, unterschiedslos von Statten.

Mit Chlorzinkjod färbt sich das extrahirte und gewaschene Holz intensiv violett. Diese Färbung ist mit kalter Salzsäure oder kalter concentrirter Zinkchloridlösung allein nicht zu erzielen.

Die Eigenschaften der isolirten Substanz.

Obwohl es mir in einzelnen Versuchen gelungen ist, ganz geringe Mengen farbloser nadelförmiger Krystalle des Körpers zu erhalten, so lieferten dennoch sämmtliche Darstellungen im grösseren Massstabe bisher keine tadellosen Produkte. Die Substanz war stets gelbbraun gefärbt und nicht schön krystallisirt. Vielleicht würden mehrmalige Ueberführung in die Bisulfitverbindung und oftmaliges Umkrystallisiren aus Ligroin zum Ziele führen, da besonders die Spuren zäh anhaftender, der Verunreinigung mit Furfurol entstammender Produkte hemmend wirken; allein dazu gehören grössere Substanzmengen, und bei den mir zur Verfügung stehenden Laboratoriumsmitteln bot bereits die Verarbeitung weniger Kilogramm Holz grosse Schwierigkeiten. Die Substanz stellt ein hellgelb braunes Pulver dar, von angenehm aromatischem Geruche, welcher eigentlich erst beim schwachen Erwärmen deutlich hervortritt und einerseits an Vanille, andererseits an den Tintengeruch vieler Gerbstoffe erinnert. Das Pulver ist mikroskopisch krystallinisch, optisch doppeltbrechend und besteht aus grösseren und kleineren kugelförmigen Krystalldrusen, aus welchen die Einzelindividuen als Höcker oder Spitzen mit krummen Flächen vorragen. Auf dem Platinblech erhitzt, schmilzt der Körper sofort zu einem braunen Tropfen zusammen und verflüchtigt sich unterhalb der Rothgluthtemperatur unter Entwicklung weisser Dämpfe, ohne Hinterlassung eines Aschenrückstandes.

Die Schmelzpunktbestimmungen ergaben, dass der Körper zwischen 50 und 60° C. etwas zusammensintert und zwischen 75—80° C. schmilzt. Hierbei ist zu bemerken, dass bei Substanzen, in deren Verwandtschaft nach den weiteren Darlegungen unser Körper zu zählen ist, schon bei relativ geringer

Verunreinigung eine bedeutende Schmelzpunkterniedrigung eintritt,¹⁾ und es ist mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass der richtige Schmelzpunkt ein höherer ist, als der gefundene.

Von Elementaranalysen habe ich vorläufig Abstand genommen, bis mir genügende Mengen möglichst reiner Substanz zur Verfügung stehen.

Die qualitative Prüfung auf Stickstoffgehalt ergab ein negatives Resultat.

Der Körper ist in heissem Wasser schwer löslich; er schmilzt Anfangs unter Wasser und löst sich während des Kochens zum Theil auf. Durch Abkühlen scheidet sich die gelöste Substanz als weisse Trübung wieder aus. In verdünntem Alkohol löst sich bereits ziemlich viel. Leicht gelöst wird die Substanz von starkem Alkohol, Aether, Methylalkohol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, kochendem Ligroin, Benzol Xylol etc. In kaltem Ligroin ist sie wenig löslich.

Alle Lösungen reagiren neutral.

Alkalien, auch Ammoniak, Erdalkalien, lösen mit intensiv gelber Farbe. Säuren fällen hieraus in weissen Flocken. Aus der alkalischen Lösung ist die Substanz mit Aether, Benzol etc. nicht mehr auszuschütteln.

Concentrirte Schwefelsäure gibt eine intensive rothviolette Färbung, welche beim Verdünnen mit Wasser etwas blässer wird unter Entstehung einer Trübung.

Kochende concentrirte Salzsäure zerstört die Substanz, wobei die Lösung klar bleibt.

Ammoniakalische Silberlösung wird beim Stehen in der Kälte langsam, beim Kochen rasch und intensiv reducirt.

Fehling's Lösung wird nicht reducirt.

Basisches Bleiacetat fällt die Substanz in Flocken aus.

Eine Spur Eisenchlorid ruft in wässerigen oder verdünnt-alkoholischen Lösungen eine auffallende röthlich braunviolette Farbenreaction unter Niederschlagsbildung hervor.

Millon's Reagens erzeugt lebhaft rothe Färbung.

¹⁾ Vgl. Tiemann, Chem. Berichte Bd. 18, S. 1597.

Die Liebermann'sche und die Plugge'sche Phenolprobe liefern eine violette, bzw. rothe Farbenreaction.

Die Substanz gibt eine Reihe von Aldehydreactionen: Schiff's Probe positiv; Diazobenzolsulfosäure in alkalischer Lösung erzeugt Rothfärbung; ferner vereinigt sich die Substanz, wie erwähnt, mit Natriumbisulfit zu einer in Wasser leicht löslichen Verbindung.

Von aromatischen Aminen erzeugen intensive Gelbfärbung Anilinsulfat, Paratoluidin, Metaphenylendiamin, Thallin.

Mit Salzsäure und verschiedenen Phenolen sind lebhaftere Farbenreactionen zu erzielen:

Am intensivsten ist die kirschrothe Reaction mit Phloroglucin, wobei in einigermaassen concentrirten Lösungen ein violetter Niederschlag entsteht. Die kleinsten Spuren des Körpers sind mittelst dieses Reagens nachzuweisen. Ein eingetrocknetes Gemisch einer alkoholischen Lösung der Substanz und einer alkoholischen Phloroglucinlösung ist ein äusserst empfindliches Reagens auf Salzsäuredämpfe und könnte vielleicht zu analytischen Zwecken brauchbar sein; ebenso ist eine salzsäurehaltige Lösung der Substanz ein höchst empfindliches Reagens auf Phloroglucin, bedeutend empfindlicher als die von Lindt¹⁾ empfohlene Vanillinsalzsäure.

Ist die Reaction mit einer verdünnten Lösung der Substanz angestellt worden, so ist die Rothfärbung vergänglich. Sie bleibt jedoch viele Tage lang unverändert, wenn die Lösung concentrirt war.

Minder empfindlich, jedoch ebenfalls intensiv, ist die blauviolette Reaction mit Orcinsalzsäure.

α -Naphtholsalzsäure erzeugt eine blaugrüne Färbung, Resorcinsalzsäure eine violette Färbung, jedoch beide nur mit nicht stark verdünnten Lösungen der Substanz. Phenolsalzsäure gibt Grünfärbung. Stellt man die letztere Probe unter Zusatz von etwas Kaliumchlorat (nach Tommasi) an, so erhält man einen gelbbraunen Niederschlag. Aehnlich ist der Erfolg bei der Thymolsalzsäurereaction mit Zusatz von Kalium-

1) O. Lindt, Zeitschr. f. wissnesch. Mikroskopie, Bd. II, S. 496.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. XXVII.

chlorat. Diese Reactionen fallen also anders aus, als beim Holze, während sonst sämtliche «Ligninreactionen» von dem aufgefundenen Körper vollkommen identisch wiedergegeben werden.

Mit Wasserdampf ist die Substanz nicht flüchtig und daher durch Destillation nicht überzutreiben.

Mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat auf dem Wasserbade eine Zeit lang erwärmt, trübt sich eine Lösung der Substanz unter Entstehung eines Niederschlages, welcher aus Alkohol krystallinisch erhalten werden kann.

Auch eine Benzoylverbindung konnte nach der Schotten-Baumann'schen Methode krystallisirt erhalten werden. Diese Verbindung gibt die Phloroglucinreaction nur sehr schwach mit anderer Nuance. Nach Verseifen durch Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge wird die ursprüngliche Substanz mit ihren charakteristischen Reactionen wieder erhalten.

Nach den oben erwähnten Resultaten Lange's, welcher beim Aufschliessen von Holz durch Aetzkali bei 185° Protokatechusäure und Brenzkatechin erhalten hatte, liegt der Gedanke nahe, dass die beschriebene Substanz, als wahrscheinlicher aromatischer Aldehyd, diese Abbauprodukte beim Schmelzen mit Alkali liefern würde. Bei den diesbezüglichen Versuchen erhielt ich eine in Wasser schwer lösliche, krystallisierende Säure, welche ein unlösliches Bleisalz liefert, und die für Protokatechusäure charakteristische Eisenreaction nicht gibt. Dass dieses Produkt von Protokatechusäure verschieden war, will ich noch nicht mit Sicherheit behaupten.

Energische Behandlung der Substanz mit Natriumamalgam lieferte eine mit Wasserdämpfen in geringer Menge übergehende Verbindung, welche eine blaugrüne Eisenreaction gibt und eugenolähnlichen Geruch besitzt.

Erwärmt man die Substanz gelinde auf kurze Zeit mit Wasser und Natriumamalgam, so gelingt es, Zwischenprodukte der Reduction zu erhalten. Das Reaktionsgemisch wurde angesäuert, mit Aether extrahirt, der Aetherextract verdunstet und mit verdünntem Alkohol aufgenommen. Es ergaben sich folgende Reactionen: Schwache Phloroglucinreaction; Kochen

mit concentrirter Salzsäure bewirkte Violettfärbung und Trübung; concentrirte Schwefelsäure gab Violettfärbung; ammoniakalisches Silbernitrat wurde reducirt; alkalische Lösung gelblich gefärbt; Eisenreaction gelbbraun. Die qualitative Untersuchung liess demnach, besonders im Hinblick auf die Violettfärbung mit Salzsäure, manche Uebereinstimmung mit dem Verhalten des Coniferylalkohols erkennen.

Nach dem geschilderten Verhalten haben wir wohl einen aromatischen Aldehyd in der aufgefundenen Substanz vor uns. Dass dieser Aldehyd mit Vanillin nicht identisch ist, wird durch die intensive Gelbfärbung mit Alkalien, das starke Reductionsvermögen gegenüber ammoniakalischer Silberlösung, die braunviolette Eisenreaction, die abweichend nuancirte Ligninreaction und den abweichenden Geruch vollkommen sichergestellt.

Auf Grund der bisher eruirten Thatsachen gelang es mir nicht, den Aldehyd mit einem bereits bekannten Körper zu identificiren. Ein definitives Urtheil wird sich selbstverständlich erst nach Ermittlung der elementaranalytischen Daten, sowie der Constitution des Körpers fällen lassen.

Da ein so eminent physiologisch wichtiger und allgemein im Holze der höheren Pflanzen verbreiteter Körper eine kurze Bezeichnung verdient, so schlage ich hierfür den Namen «Hadromal» vor (Hadrom = der von Haberlandt eingeführte Terminus für das der Wasserleitung dienende Gewebssystem der Pflanzen). Nach meinen bisherigen Erfahrungen liegt in den verschiedensten Holzarten stets derselbe Körper vor. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass differente Substanzen hier und da vorkommen können.

Da aus Holz bisher keine aromatischen Produkte als Brenzkatechinderivate (Pyrokatechin selbst, Protokatechusäure) durch Abspaltung gewonnen werden konnten, so möchte ich, obwohl meine eigenen Untersuchungen zu klaren Resultaten noch nicht geführt haben, es heute für wahrscheinlich halten, dass auch das Hadromal als 1-, 3-, 4-Substitutionsprodukt des Benzols anzusehen ist.

Von Bedeutung für die Beurtheilung der Constitution des Hadromals ist die Thatsache, dass es Alkaliverbindungen ein-

geht, somit entweder ein Phenol- oder Alkoholhydroxyl enthalten muss. Wir sahen ferner einen positiven Ausfall einiger sogenannten Phenolreactionen. In dieser OH-Gruppe ist wohl auch das Hadromal im Holze ätherartig gebunden,¹⁾ nachdem Holz sich mit Alkalien nicht gelb färbt, wie der freie Aldehyd, und das Hadromal nur zum geringsten Theile direkt aus Holz extrahirbar ist.

Das Hadromal vereinigt ferner manche Merkmale der p-Oxyaldehyde.¹⁾ Die Bisulfitverbindung ist leicht löslich, das Hadromal ist in Wasser wenig löslich und geht mit Wasserdampf nicht über.

Ob man die Eisenreaction in gleichem Sinne deuten darf, erscheint mir fraglich.

Oxydation durch mehrtägiges Stehen mit 8%iger Chromsäure lieferte mir kein Vanillin.

Sehr bedeutungsvoll ist natürlich die heute noch nicht zu fällende Entscheidung, ob die oben erwähnten Reduktionsprodukte thatsächlich mit Coniferylalkohol und Eugenol etwas zu thun haben, wie einige Reactionen vermuthen lassen, oder nicht. Beziehungen zur Gruppe des Coniferylalkohols erscheinen mir nach manchen Erfahrungen derzeit nicht unwahrscheinlich.

Hoffentlich gelingt es mir bald, mich in den Besitz genügender Mengen reinen Hadromals zu setzen und die Natur dieser interessanten Substanz klar zu legen.

Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Holzsubstanz.

Nach der Entdeckung des Hadromals und der Feststellung seiner Eigenschaften wissen wir, dass die «Ligninreactionen» des Holzes im Wesentlichen durch diesen aromatischen Aldehyd bedingt sind. Zum kleinen Theil findet sich das Hadromal frei in der Holzsubstanz, durch Lösungsmittel direkt extrahirbar; zum grössten Theile ist es aber in ätherartiger Verbindung zugegen, welche durch kochendes concentrirtes Zinnchlorür wohl quantitativ unter Abscheidung des Aldehyds gespalten

¹⁾ Tiemann u. Schober, Chemisch. Berichte Bd. 11, S. 770.

werden kann. Der Aldehyd geht die Verbindung allem Anscheine nach mittelst eines Phenolhydroxyls ein.

Ueber die im Holze vorhandene Menge des Hadromals lässt sich, da keine quantitative Bestimmungsmethode existirt, nichts mehr angeben, als dass dieselbe 1—2% der Trockensubstanz des Holzes gewiss nicht übersteigt. Das Hadromal ist sicher kein Hauptbestandtheil des Holzes, wenn es auch durch äusserst intensive Farbenreaction das Holz sehr ausgeprägt charakterisirt.

Bei der Beantwortung der Frage, an welche Substanz im Holze das Hadromal gebunden ist, muss man wohl auf die oben erwähnte Thatsache zurückkommen, dass sich das mit Zinnchlorür extrahirte und ausgewaschene Holz mit Chlorzinkjodlösung intensiv violett färbt. Auch gibt das Holz nun an Kupferoxydammoniak lösliche Substanz ab. Dies lässt vermuthen, dass der Paarling des Hadromals Cellulose ist, und wir dürfen mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, dass derjenige Bestandtheil der verholzten Membran, welcher die Ligninreactionen verursacht, neben einer sehr geringen Menge freien Hadromals ein Hadromal-Celluloseäther ist.

Ob die gesammten Cellulosemoleküle der Holzsubstanz mit Hadromal gepaart sind, ist mir sehr zweifelhaft. Ich habe nicht hinreichend eingehende Untersuchungen hierüber angestellt, allein es scheint mir nicht, als ob man aus dem mit Zinnchlorür extrahirten Holze die Gesamtcellulose mit Kupferoxydammoniak in Lösung überführen könne, wenigstens nach meinen bisherigen Versuchen. Es steht gegenwärtig der Anschauung ebenfalls noch nichts im Wege, dass nach Hoppe-Seyler noch andere Celluloseäther im Holze vorliegen.

Für unaufgeklärt möchte ich endlich die Frage nach einem geringen Coniferingehalt des Holzes ansehen, welcher von zahlreichen Seiten der Vermuthung Tiemann-Haarmann's gemäss behauptet worden ist. So wahrscheinlich a priori die Gegenwart einer kleinen Menge dieser im Cambialsaft sehr verbreiteten Substanz für das Holz ist, so wenig beweisen die Reactionen etwas, welche man für die genannte

Anschauung ins Treffen geführt hat. Ich schliesse mich vollkommen den Bedenken Udranszky's an und kann bezüglich der Phenol-Salzsäureprobe in der Tommasi'schen Modification die Möglichkeit einer Furfurolreaction nicht in Abrede stellen, besonders nachdem sich das Hadromal abweichend verhält. Bekanntlich gibt eine wässrige Coniferinlösung mit concentrirter Salzsäure eine schöne blauviolette Färbung. Das Glycosid des Oxymethylconiferylalkohols, das Syringin, gibt gleichfalls mit Salzsäure eine violette Reaction. Der Oxymethylconiferylalkohol selbst (Syringenin) färbt sich mit Salzsäure schön himmelblau. Wie bereits mehrere Autoren Bedenken tragend hervorhoben, färbt sich die Holzsubstanz mit Salzsäure nie blau, sondern gelb bis grünlichgelb. Dies könnte natürlich eine Mischfarbenreaction sein. Udranszky beobachtete nach längerem Kochen mit Salzsäure stellenweise Violett färbung von Holzspänen, namentlich an der Grenze der Jahresringe. Mit Zinnchlorür extrahirtes Holz färbt sich, mit Salzsäure gekocht, sehr bald dunkelviolet, ähnlich wie Coniferin. Trotzdem aber möchte ich auf Grund anderer Erfahrungen zögern, einen Coniferin gehalt des Holzes anzunehmen. Mit dem von Molisch als «Coniferinreagens» empfohlenen Thymol-Salzsäure-Kaliumchloral-Gemisch färbt sich Holz, wie Molisch angibt, rasch lebhaft grasgrün. Reines Coniferin (Merck) verhält sich jedoch anders, wie ich im Gegensatze zu Molisch feststellen will. Znnächst tritt eine prachtvoll blauviolette Farbe ein (wohl durch die Salzsäure bedingt), welche schnell nach Roth und schliesslich Rothorange umschlägt. Hadromal färbt sich mit dem Reagens erst rothbraun, dann dottergelb. Mit Zinnchlorür extrahirtes Holz wird durch die gleiche Behandlung braungelb. Nach Allem muss ich es also noch als fraglich betrachten, ob verholzte Membranen Coniferin enthalten.

Ueber das Verhalten des salzsauren Glycosamins im Thierkörper.

Von
Dr. Edmund Fabian.

Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie und experimentelle Pharmakologie zu
Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 15. März 1899.)

Das von Ledderhose¹⁾ zuerst aus dem Chitin dargestellte salzsaure Glycosamin ist ein Amidoderivat eines Zuckers, welches mit dem Traubenzucker die Fähigkeit gemein hat, Fehling'sche Lösung zu reduciren und die Ebene des polarisirten Lichtes nach rechts zu drehen. Die ursprüngliche Auffassung Ledderhose's, es sei ein Derivat des Traubenzuckers, hat sich nicht bestätigt; vielmehr haben die späteren Untersuchungen des Entdeckers selbst, wie diejenigen Tiemann's²⁾ dargethan, dass der aus Glycosamin durch Einwirkung von salpetriger Säure als Syrup erhältliche Zucker nicht gährungsfähig ist, und dass das Glycosamin andere Oxydationsprodukte liefert, als der Traubenzucker. Es muss deshalb auf Grund der heute vorliegenden Erfahrungen angenommen werden, dass das Glycosamin sich nicht vom Traubenzucker ableitet, obwohl die Osazone beider Verbindungen, wie Tiemann nachwies, identisch sind.

Ein Isomeres des Glycosamins erhielt E. Fischer³⁾ durch Reduction von Phenylglucosazon. Da er dieses durch salpetrige

1) Ledderhose, Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. II, S. 213 u. Bd. IV, S. 139.

2) Tiemann, Ber. d. d. chem. Gesellschaft, Bd. XVII, S. 244 u. Bd. XIX, S. 50 u. S. 1257.

3) E. Fischer, Ber. d. d. chem. Gesellschaft, Bd. XIX, S. 1921.

Säure in Lävulose überführen konnte, legte er ihm die Strukturformel:



bei. Gleichzeitig sprach er die Vermuthung aus, dass das Glycosamin selbst zum Traubenzucker in derselben Beziehung stehe, wie das Isoglycosamin zur Lävulose, dass ihm somit die Strukturformel:



zukomme.

Der in stereochemischer Beziehung bestehende Widerspruch zwischen dem Uebergang in Isozuckersäure einerseits und der Bildung von Phenylglucosazon andererseits ist bisher nicht behoben.

Wie die Entstehungsgeschichte des Isoglycosamins beweist, kommt den Amidoderivaten der Zucker insofern eine besondere Bedeutung zu, als sie einen Uebergang von rechtsdrehenden zu linksdrehenden Zuckern bilden können.

Ueber die Frage, ob das salzsaure Glycosamin im Thierkörper einen solchen Uebergang durchmache, konnte eine Prüfung seines physiologischen Verhaltens möglicher Weise Aufschluss geben, und weiterhin schien es lohnend, zu prüfen, ob die Gesetzmässigkeiten, welche zwischen Glycogenbildung und Gährfähigkeit für eine Reihe von Zuckern festgestellt sind, auch für dieses Amidderivat eines Zuckers bestehen.

Von diesen Erwägungen ausgehend, untersuchte ich auf Veranlassung des Herrn Geh. Rath Jaffé das Verhalten des salzsauren Glycosamins in Bezug auf Glycogenbildung, etwaige Veränderungen im Darmkanal und Erscheinen im Urin.

I. Einfluss auf die Glycogenbildung.

a. Historisches.

Was zunächst die Frage der Glycogenbildung im Allgemeinen betrifft, so dürfte heute feststehen, dass im thierischen Organismus Glycogen sowohl aus Eiweiss wie aus Kohlehydraten entstehen kann. Die Auffassung, der Befund grösserer Glycogenmengen in der Leber beim Hungerkaninchen nach Fütterung

mit Kohlehydraten stamme aus dem Eiweiss her, die Kohlehydrate wirkten nur sparend auf die Glycogenzersetzung, ist durch Rubner's¹⁾ Untersuchungen widerlegt. Rubner berechnete die Mengen Leberglycogen, die in maximo aus Eiweiss bei hungernden Kaninchen innerhalb 8—10 Stunden entstehen können, und gibt dafür folgende Werthe an:

für Leberglycogen: 0,66—1,52 gr.

für Leber- + Muskelglycogen: 1,33—3,04 gr.

Es sind daher diese Werthe bei der Prüfung eines Kohlehydrates als Glycogenbildner als untere Grenzwerte zu betrachten und nur diejenigen Kohlehydrate als Glycogenbildner anzusehen, nach deren Verfütterung man grössere Werthe als die oben angegebenen erhält.

Die Fähigkeit, Glycogen zu bilden, kommt nur einer kleinen Zahl von Kohlehydraten der Reihen C_6 und C_{12} zu, welche hier allein besprochen werden sollen. Die Untersuchungen von Külz,²⁾ C. Voit³⁾ und seinen Schülern, unter diesen besonders Cremer⁴⁾ haben gezeigt, dass als unzweifelhafte Glycogenbildner zu betrachten sind der Traubenzucker, der Fruchtzucker, der Rohrzucker und die Maltose.

Diese Kohlehydrate liefern mit Ausnahme der Lävulose im Darmkanal Traubenzucker; sie sind sämtlich durch gewöhnliche Sprosshefen vergährbar und die Assimilationsgrenze des Organismus für diese Körper liegt recht hoch. M. Cremer bezeichnet auch die Isomaltose als Glycogenbildner, da er nach ihrer Verfütterung 5,84% Leberglycogen erhielt. Sie ist, wenn auch schwer, vergährbar und entsteht beim Säureabbau des Glycogens direkt aus diesem. Es wäre daher denkbar, dass umgekehrt im Organismus die Isomaltose direkt zu Glycogen wird.

Getheilt sind die Meinungen noch über die d-Mannose, die d-Galactose und den Milchzucker. Sie haben nicht sämt-

1) Rubner, Zeitschrift für Biologie, Bd. XVII.

2) Külz, Beiträge zur Kenntniss des Glycogens. Festschrift für Ludwig. Marburg 1890.

3) C. Voit, Zeitschrift für Biologie, Bd. XXVIII, S. 245.

4) M. Cremer, Zeitschrift für Biologie, Bd. XXIX, S. 481, Bd. XXXI, S. 183 u. Bd. XXXII, S. 49.

liche oben angegebenen Eigenschaften der echten Glycogenbildner. Der Milchzucker ist nur mit einigen wenigen Hefearten vergährbar, alle drei bleiben im Darmkanal unverändert und gehen bereits nach Verabreichung kleiner Gaben unverändert in den Harn über. Die von Külz und C. Voit gefundenen Glycogenmengen sind auch nur gering; aber alle diese Untersuchungen sind an Kaninchen gemacht; und Kausch und Socin¹⁾ haben gezeigt, dass der Hund sich ganz anders verhält. Sie erhielten nach Milchzuckerfütterung beim Kaninchen einen Leberglycogengehalt von 1,72—2,332%, beim Hunde einen solchen von 8,12—9,82%: nach d-Galactose-Fütterung beim Hunde 6,73%. Es wird daher von Kausch und Socin die Möglichkeit des direkten Ueberganges dieser Körper in Glycogen angenommen und diese Annahme durch folgende Befunde von Minkowski²⁾ und F. Voit³⁾ gestützt. Ersterer fand beim pankreasten Hunde sowohl nach Lävulose- wie nach Milchzuckerfütterung eine Vermehrung des Traubenzuckergehaltes des Harns: F. Voit fand dasselbe nach d-Galactose-Zufuhr beim diabetischen Menschen. Schliesslich sei auch an die Untersuchungen Cremers⁴⁾ über die Carenzhefe erinnert. Nach ihm vermag die glycogenfrei gemachte Hefezelle aus d-Mannose wie aus d-Galactose ihr Glycogen aufzubauen.

Sehen wir von diesen Kohlehydraten ab, über deren Bedeutung als Glycogenbildner der endgültige Entscheid noch fehlt, so gilt bis jetzt der Voit-Cremer'sche Satz zu Recht:

«Diejenigen Zuckerarten sind echte Glycogenbildner, die mit Hefe alkoholische Gährung eingehen, und die nur schwer in den Harn übergehen.»

Meine eigenen Untersuchungen über das salzsaure Glycosamin geben einen weiteren Stützpunkt für diese Theorie.

1) Kausch u. Socin. Archiv für exper. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XXXI, S. 398.

2) Minkowski, Archiv für exper. Pathologie und Pharmakologie Bd. XXXI.

3) F. Voit, Zeitschrift für Biologie, Bd. XXVIII, S. 353.

4) Cremer, Zeitschrift für Biologie, Bd. XXXI.

b. Eigene Versuche.

Bestimmungen des Glycogens von Hungerkaninchen nach Verfütterung des salzsauren Glycosamins.

(Methode: Külz-Brücke.)

1. Versuch. Kaninchen 1800 gr. 5 Hungertage (16. Juni bis 20. Juni 1898). 21. Juni. Morgens 7 $\frac{1}{4}$ Uhr: 15 gr. salzsaures Glycosamin in Wasser gelöst + 3 gr. Soda mittelst der Schlundsonde eingegossen. 21. Juni, Nachmittags 5 $\frac{1}{4}$ Uhr: Kaninchen getödtet. Gewicht der Leber: 50 gr. Gewicht der Muskulatur: 425 gr. Leberglycogen: 0,094 gr.

(Die Hälfte etwa der in KOH aufgeschlossenen Lebersubstanz ging leider verloren, so dass man die oben angegebene Glycogenmenge verdoppeln muss, um den wahren Glycogengehalt zu erhalten). Es würde danach die Menge des Leberglycogens betragen: 0,118 gr.

Glycogen der Muskulatur: 0,3364 gr.

Gesammtglycogenmenge des Thieres: 0,5244 gr.

2. Versuch. Kaninchen 1690 gr. 5 Hungertage (24. Juni bis 28. Juni 1898). 28. Juni, Abends 7 Uhr, erhält das Thier mit der Schlundsonde 15 gr. salzsaures Glycosamin + 6 gr. Soda in Wasser gelöst. 29. Juni, Morgens 7 $\frac{1}{4}$ Uhr: Kaninchen getödtet. Gewicht der Leber: 35 gr. Gewicht der Muskulatur: 440 gr. Leberglycogen: 0,043 gr. Muskelglycogen: 0,332 gr. Gesamtglycogenmenge des Thieres: 0,375 gr.

3. Versuch. Kaninchen 2185 gr. 5 Hungertage (22. Juli bis 26. Juli 1898). 26. Juli. Abends 7 $\frac{1}{4}$ Uhr: 15 gr. salzsaures Glycosamin + 6 gr. Soda in Wasser gelöst, mittelst Schlundsonde eingegossen. 27. Juli, Morgens 7 $\frac{3}{4}$ Uhr: Kaninchen getödtet. Gewicht der Leber: 42 gr. Leberglycogen: 0,295 gr.

Um den Leber- und Muskelglycogengehalt am Schlusse der fünftägigen Hungerperiode bei einem Normal-Kaninchen im Vergleich zu den eben angeführten Versuchen festzustellen, wurde ein solcher gleichzeitig mit Versuch 2 unternommen.

Kaninchen 2090 gr. 5 Hungertage (24. Juni bis 28. Juni 1898). 29. Juni. Vormittags 11 $\frac{1}{4}$ Uhr: Kaninchen getödtet. Gewicht der Leber: 39 gr. Gewicht der Muskulatur 580 gr. Leberglycogen: 0,166 gr. Muskelglycogen: 0,286 gr. Gesamtglycogenmenge des Thieres: 0,452 gr.

Diese drei Versuche dürften beweisen, dass das salzsaure Glycosamin kein Glycogenbildner ist. Die erhaltenen Werthe des Leberglycogens (0,118; 0,043; 0,295 gr.) bleiben innerhalb der von Rubner für die Entstehungsmöglichkeit aus Eiweiss angegebenen Grenzwerte und stimmen auch mit dem von mir

im Kontrollversuch beim Hungerkaninchen gefundenen Werthe (0,166 gr.) ungefähr überein.

II. Verhalten im Darmkanal.

Um zu prüfen, wie viel von der verabreichten Substanz resorbirt wurde, und gleichzeitig um zu untersuchen, ob das salzsaure Glycosamin im Darmkanal des Kaninchens eine chemische Veränderung erlitt, wurde im Versuche 3 der Magen und gesammte Darm abgebunden und herausgenommen. Der Inhalt wurde zuerst ausgedrückt, dann ausgespritzt, schliesslich der Darm eröffnet und seine Schleimhaut abgespült. Die gesammte Masse wurde mit 5 ccm. verdünnter Essigsäure versetzt, gekocht und zuerst durch Leinwand, dann durch ein Faltenfilter filtrirt. Die Gesammtflüssigkeit betrug 560 ccm.; sie war hellbraun, klar, durchsichtig, reagirte sauer. Die Trommer'sche Probe war deutlich positiv. Die Menge der in ihr enthaltenen reducirenden Substanz wurde mit Schmiedeberg'scher Mannit-Kupferlösung bestimmt.

1 ccm. der Schmiedeberg'schen Lösung entsprach 5,578 mgr. salzsauren Glycosamins.

Es wurden 13,5 ccm. der auf die Hälfte verdünnten Flüssigkeit zur Reduction von 10 ccm. Schmiedeberg'scher Lösung gebraucht.

Der Gehalt an reducirender Substanz, auf salzsaures Glycosamin berechnet, betrug also: 4,626 gr. oder 0,88%. Es wurden also im Darminhalt 31% des eingeführten salzsauren Glycosamins gefunden. Die polarimetrische Bestimmung, auf salzsaures Glycosamin berechnet, ergab 0,38%¹⁾

Ich bediente mich nun, um über die Natur dieses reducirenden Körpers Aufklärung zu erhalten, der Methode Baumanns²⁾ nach der man das gesuchte Kohlehydrat als Benzoësäureester darstellt, und welche für das salzsaure Glycosamin speciell von Kueny³⁾ und Pum⁴⁾ erprobt wurde.

1) Ueber die Beziehung zwischen polarimetrischer und titrimetrischer Bestimmung siehe weiter unten.

2) Baumann, Ber. d. d. chem. Gesellschaft, Bd. XIX, S. 3220.

3) Kueny, Zeitschrift für phys. Chemie, Bd. XIV, S. 330.

4) Pum, Monatshefte für Chemie, Bd. XII, S. 435.

Es wurden 90 ccm. des Darminhaltes mit 28 ccm. 10° iger NaOH und 5 ccm. Benzoylchlorid, entsprechend den Angaben Baumann's, versetzt und so lange geschüttelt, bis das Benzoylchlorid durch den Geruch nicht mehr nachweisbar war. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, in kaltem Alkohol verrieben und einige Stunden stehen gelassen, um etwa gebildete, niedrigere Benzoate durch Lösen in demselben zu entfernen. Die Hauptmasse wurde dann in wenig heissem Alkohol gelöst und krystallisirte aus demselben beim Erkalten. Ist der gesuchte Körper Glycosamin, so erhält man nach dieser Methode, wie Kueny angibt, das Tetrabenzoylglycosamin mit folgenden Eigenschaften:

Es ist schneeweiss, krystallisirt in feinen Nadelchen, ist in Wasser wie in verdünnten Säuren unlöslich; sehr schwer löslich in Aether; ziemlich leicht löslich in heissem Alkohol, Benzol, Eisessig und besonders Chloroform. Sein Schmelzpunkt liegt bei 197—198°.

Aus dem Darminhalte habe ich diese Substanz darstellen können. Sie war bei dem erstmaligen Krystallisiren aus heissem Alkohol gelb; ihr Schmelzpunkt 194—195°. Sie wurde daher noch einmal in wenig heissem Alkohol gelöst und krystallisirte nun in weissen Krystallen; ihr Schmelzpunkt lag bei 198°.

III. Ausscheidung im Urin.

Bei der Betrachtung der Assimilationsgrenze des Organismus für die einzelnen Kohlehydrate ist eine Trennung vorzunehmen nach der Form der Application, und zwar kommen die Zufuhr per os und die subcutane Injection in Betracht.

Hofmeister¹⁾ bestimmte für Traubenzucker, Fruchtzucker, Rohrzucker, Lactose und Galactose ihre Grenzwerte nach ihrer Verfütterung beim Hunde und fand dieselben für die ersten drei etwa zwischen 5 und 10 gr., für Lactose zwischen 1 und 2 gr., für Galactose zwischen $\frac{1}{2}$ und 1 gr. schwanken.

1) Hofmeister, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXV, S. 240.

F. Voit¹⁾ hat in letzter Zeit in einer eingehenden Arbeit die Assimilationsfähigkeit des menschlichen Organismus für eine grosse Reihe von Kohlehydraten nach ihrer subcutanen Injection geprüft; hier seien von denselben nur die Hexosen und Hexoliosen erwähnt.

Während noch in recht hohen Quantitäten der Traubenzucker (60 gr.), der Fruchtzucker (30 gr.), die Galactose (30 gr.) und die Maltose (27 gr.) verwerthet werden, d. h. keine reducirende Substanz oder nur Spuren derselben im Urin erscheinen, werden Rohrzucker und Lactose bereits nach Gaben von 1,27 bezw. 1,09 gr. nahezu quantitativ ausgeschieden.

Diese Versuche bestätigen die weiter oben bereits erwähnten gesetzmässigen Beziehungen zwischen Assimilationsfähigkeit des Organismus, Gährfähigkeit und Glycogenbildung. Dass für die ausgiebige Verwerthung des Rohrzuckers durch den Organismus seine Spaltung im Darmkanal Voraussetzung ist, ist ebenfalls schon erwähnt und findet eine Bestätigung in seiner nahezu quantitativen Ausscheidung nach subcutaner Injection. Das widerspruchsvolle Verhalten der Galactose bedarf noch weiterer Aufklärung.

Auch in meinen Versuchen mit dem salzsauren Glycosamin wurde seine Ausscheidung im Urin nach beiden Arten der Zufuhr geprüft.

a. Zufuhr per os.

1. Kaninchen. 15. Juli. Nachmittags 6 Uhr: 3 gr. salzsaures Glycosamin + 1 gr. Soda in Lösung mittelst der Schlundsonde eingegossen. Urin frei von Zucker und Eiweiss. 16. Juli, Vormittags 10 Uhr: 53 ccm. Urin. Trommer'sche Probe negativ. Vormittags 11 Uhr: 3 gr. salzsaures Glycosamin. 18. Juli, Vormittags 9 Uhr: 130 ccm. Urin. Trommer'sche Probe und Polarisation negativ.

2. Der Urin des Kaninchens im Versuch 1 (15 gr. salzsaures Glycosamin) wird kurz vor dem Tode entleert. Vor Eingabe des salzsauren Glycosamins war er frei von Zucker und Eiweiss. 105 ccm. Urin. Trommer'sche Probe positiv. Gährungsprobe negativ.

¹⁾ F. Voit, Deutsches Archiv f. klinische Medicin. 1897. Bd. LVIII. S. 523.

Polarisation: 3,67%, auf salzsaures Glycosamin berechnet.¹⁾ Titrimetrische Bestimmung: 3,74%, ebenfalls auf salzsaures Glycosamin berechnet.²⁾

Es wurden also, die durch titrimetrische Bestimmung gewonnene Zahl zu Grunde gelegt, 26% des eingegebenen salzsauren Glycosamins im Urin ausgeschieden.

3. Urin aus Versuch 2 (15 gr. salzsaures Glycosamin). Es werden 160 ccm. Urin kurz vor dem Tode entleert. Trommer'sche Probe positiv. Gährungsprobe negativ. Polarisation: 0,6% (salzsaures Glycosamin). Titrimetrische Bestimmung: 0,45% (salzsaures Glycosamin).

5% des eingeführten salzsauren Glycosamins wurden also im Urin ausgeschieden.

4. Urin aus Versuch 3 (15 gr. salzsaures Glycosamin). 88 ccm. Urin. Trommer'sche Probe positiv. Polarisation: 0,3% (salzsaures Glycosamin). Titrirung: 0,375% (salzsaures Glycosamin).

Es wurden also 2% des eingeführten salzsauren Glycosamins im Urin ausgeschieden.

Um zu entscheiden, ob die reducirende Substanz im Urin Glycosamin ist, wurde der Versuch gemacht, in der oben bereits angegebenen Weise nach Baumann's Methode das Benzoat des Glycosamins darzustellen. Es krystallisirte jedoch nichts aus heissem Alkohol aus. Zur Erklärung hierfür sei bemerkt, dass selbst bei Anwendung relativ grosser Mengen reinen salzsauren Glycosamins die Ausbeute am krystallisirenden Benzoate eine recht geringe ist, da gleichzeitig nicht krystallisirende niedrigere Benzoate entstehen.

Es wurden daher in einem neuen Versuche 20 gr. salzsaures Glycosamin statt der bisher verabreichten 15 gr. per os eingeführt.

5. Kaninchen. 1. August, Abends 7 1/4 Uhr: 20 gr. salzsaures Glycosamin + 8 gr. Soda. Gesamtmenge des reducirenden Urins: 216 ccm. Die Ausscheidung reducirenden Urins dauerte etwa 48 Stunden. Trommer'sche Probe positiv. Polarisation: 0,19% (salzsaures Glycosamin). Titrirung: 1,7% (salzsaures Glycosamin).

Es wurden also 18% des eingeführten salzsauren Glycosamins im Urin ausgeschieden.

1) Mit einer 5,05%igen Lösung erhielt ich eine Rechtsdrehung von 6,6% (auf Traubenzucker berechnet).

2) 1 ccm. Schmiedeberg'scher Kupfer-Mannit-Lösung entspricht 5,578 mgr. salzsauren Glycosamins.

100 ccm. Urin werden nach Baumann mit 60 ccm. 10% iger NaOH und 8 ccm. Benzoylchlorid verarbeitet. Schmelzpunkt der aus heissem Alkohol krystallisirenden Substanz 194°; nach einmaligem Umkrystallisiren: 204—205°.

Es besteht zur Zeit noch ein Widerspruch in den Angaben über den Schmelzpunkt und die Constitution des krystallinisch erhaltenen Benzoates des Glycosamins. Kueny giebt den Schmelzpunkt von 197—198°, Pum einen von 203° an. Ich fand bei Darstellung des Benzoates aus dem Darminhalte, wie aus dem Urin nach subcutaner Zufuhr des salzsauren Glycosamins einen Schmelzpunkt von 198°; im Versuche 5 ziemlich genau den von Pum angegebenen Schmelzpunkt.

Die Frage, ob es sich in einem Falle um den Tetra-Ester, im andern um den Penta-Ester handelt, worüber zwischen Kueny und Pum eine unaufgeklärte Meinungsdivergenz besteht, liess sich bei den geringen Substanzmengen natürlich nicht entscheiden. Immerhin scheint mir der abweichende Schmelzpunkt nicht dafür zu sprechen, dass es sich bei der Ausscheidung im Urin im Versuch 5 um ein anderes Produkt als Glycosamin gehandelt habe.

b. Subcutane Injection.

1. Versuch. Einem Kaninchen wurden am 12. August, Mittags 1 Uhr, 2 gr. salzsaures Glycosamin in wässriger Lösung und Abends 7 Uhr wiederum 2 gr. subcutan injicirt.

Der Urin war vor den Injectionen frei von reducirender Substanz.

Der Nachmittags 5 Uhr entleerte Urin gab bereits deutliche Trommer'sche Probe. Die Ausscheidung des reducirenden Urins dauerte 24 Stunden.

Gesamtmenge desselben: 100 ccm.

Polarisation: 1,22% (salzsaures Glycosamin).

Titrirung: 2,79% „ „

2. Versuch. Kaninchen. 18. Juli, Abends 7 Uhr: 3 gr. salzsaures Glycosamin subcutan. 19. Juli, Vormittags 8³/₄ Uhr: 3 gr. salzsaures Glycosamin subcutan.

Die Ausscheidung des reducirenden Urins dauerte 24 Stunden.

Gesamtmenge desselben: 177 ccm.

Polarisation: 1,4% (salzsaures Glycosamin).

Titrirung: 2,8% „ „

In beiden Versuchen gelang die Darstellung des Benzoates des Glycosamins nach Baumann's Methode: dasselbe hatte den Schmelzpunkt 197—198°.

Berechnet man den oben nach titrimetrischer Bestimmung angegebenen Procentgehalt des salzsauren Glycosamins auf Gramm, so erhalten wir im Versuche 1: 2,79 gr. (nach subcutaner Injection von 4 gr.), im Versuche 2: 4,99 gr. (nach subcutaner Injection von 6 gr.) Es sind also im Versuche 1: 70%, im Versuche 2: 83% des injicirten salzsauren Glycosamins im Urin ausgeschieden.

Es erübrigt noch zu erwähnen, dass eine constante Beziehung zwischen den durch Polarisation und Titrirung gewonnenen Zahlen sich nicht hat ermitteln lassen. Die Berechnung der Procentzahlen auf salzsaures Glycosamin ist insofern eine willkürliche, als bis jetzt noch nicht bekannt ist, ob das Glycosamin wirklich als salzsaures Salz im Urin erscheint, die specifische Drehung des freien Glycosamins und anderer Salze desselben aber von derjenigen des salzsauren Glycosamins erheblich abweicht.

Zum Schlusse fasse ich die Resultate der Versuche zusammen:

1. Das salzsaure Glycosamin ist kein Glycogenbildner.
2. Noch 12 Stunden nach seiner Verfütterung lässt sich Glycosamin im Darmkanal nachweisen.
3. Es geht nach Verfütterung von Gaben von 15—20 gr. theilweise in den Harn über; nach Verfütterung kleinerer Gaben (3 gr.) nicht.
4. Nach subcutaner Injection selbst kleiner Gaben (2—3 gr.) erscheint es grösstentheils im Urin wieder.

Es sei mir gestattet, am Schlusse dieser Arbeit Herrn Geh. Rat Prof Dr. Jaffé für die Anregung zu derselben, wie für die oft ertheilten Rathschläge meinen aufrichtigen Dank zu sagen. Ebenso danke ich Herrn Dr. Ellinger, Assistenten am Laboratorium, für die gütigst gewährte Unterstützung.

Ueber das Arginin.

Von

Wl. Gulewitsch.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 22. März 1899.)

Das Arginin wurde von Schulze und Steiger¹⁾ in den Cotyledonen der Lupinenkeimlinge im Jahre 1886 entdeckt, und diese Beobachtung blieb einige Jahre ganz vereinzelt, bis das Arginin im Jahre 1894 von Hedin als Spaltungsprodukt von Hornsubstanz²⁾ und überhaupt von Eiweisskörpern³⁾ aufgefunden wurde und dadurch ein neues Interesse für die physiologische Chemie gewann. Die weiteren Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Körper eine hervorragende Bedeutung in der biologischen Chemie haben muss, nachdem A. Kossel⁴⁾ im Jahre 1896 gefunden hat, dass das Arginin sich bei der Spaltung der Protamine sowohl durch Säuren, wie durch Trypsin bildet, und durch die Untersuchungen von Kutscher⁵⁾ festgestellt ist, dass es auch bei künstlicher Trypsinverdauung der Eiweisskörper entsteht. Durch die Untersuchungen von Schulze und Likiernik⁶⁾ wurde das Arginin

1) E. Schulze und E. Steiger, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 1177; diese Zeitschr., Bd. XI, S. 43.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XX, S. 186.

3) S. G. Hedin, *ibid.*, Bd. XXI, S. 155.

4) A. Kossel, *ibid.*, Bd. XXII, S. 176. A. Kossel und A. Mathews. *ibid.*, Bd. XXII, S. 190.

5) Fr. Kutscher, *ibid.*, Bd. XXV, S. 195.

6) E. Schulze und A. Likiernik, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXIV, S. 2701.

in eine nahe Beziehung zu den Processen der Harnstoffbildung im Organismus gebracht, durch die von Schulze und Winterstein¹⁾ wurde die Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins bewiesen; endlich ist durch die neuerdings publicirten Versuche von Ellinger²⁾ bewiesen, dass das Arginin als Muttersubstanz des Putrescins betrachtet werden muss.

Bei dieser immer zunehmenden Bedeutung des Arginins für die Biologie war es von Interesse, die Verbindungen desselben genauer kennen zu lernen, besonders diejenigen, welche für die Isolirung und die Identificirung dieser Base dienen können. Darum habe ich bereitwillig den Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel angenommen, solche Untersuchungen einiger Verbindungen des Arginins auszuführen.

Das Arginin, welches den ausgezeichneten Untersuchungen von Schulze und Steiger (l. c.) zu Grunde lag, war aus pflanzlichem Material dargestellt. Nachdem sich nun aus meinen Beobachtungen ergeben hatte, dass das vegetabilische Arginin von dem thierischen verschieden ist, habe ich ausser den von mir neu dargestellten Verbindungen des Arginins auch die bereits beschriebenen noch einer genaueren Untersuchung unterzogen. Ich bezeichne das thierische Arginin als ζ -Arginin (Zooarginin) im Gegensatz zu dem aus Pflanzen gewonnenen φ -Arginin (Phytoarginin) von Schulze und Steiger.

Bevor ich die Resultate meiner Arbeit zusammenfassen werde, will ich zuerst ein lebhaftes Bedürfniss erfüllen, indem ich Herrn Prof. A. Kossel meinen verbindlichsten Dank abstatte für die Ueberlassung der Themata und für die Unterstützung bei dieser und den folgenden Untersuchungen.

Die für meine Untersuchungen nöthige Menge von Arginin habe ich zum Theil durch die Güte des Herrn Prof. A. Kossel in Form schon ziemlich reiner, hauptsächlich aus dem Clupein

1) E. Schulze und E. Winterstein, *ibid.*, Bd. XXX, S. 2879; diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 1.

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 3183.

gewonnener Präparate bekommen. zum Theil habe ich es selbst aus den Testikeln von 127 Häringen dargestellt.

Zu meiner Arbeit habe ich gesalzene Häringe benutzt, deren herausgenommene Testikeln zuerst in fließendem Wasser während 48 Stunden ausgewaschen wurden.¹⁾ Die vom Kochsalz durch Auswaschen möglichst befreiten und fein zerhackten Testikeln wurden in 3 Portionen verarbeitet. Auf je 100 gr. Trockenrückstand von Testikeln wurden je 900 ccm. verdünnter Schwefelsäure (1 Volumen concentrirter Schwefelsäure und 2 Volumen Wasser) verwandt, wobei der Trockenrückstand als 20% der feuchten Testikeln angenommen und bei dem Verdünnen der Säure auch das Wasser mitgerechnet wurde, welches in den Testikeln vorhanden war, so dass zu je 300 ccm. der Säure nur je 200 ccm. Wasser zugesetzt wurden. Die Mischung wurde im Paraffinbade im Rundkolben mit aufsteigendem Kühler während 8 Stunden gekocht, dann mit Wasser verdünnt und mit Kalk neutralisirt, der enorme Niederschlag mit Hilfe der für solche Zwecke fast unentbehrlichen Kosselschen Filtrirvorrichtung abgesaugt, mit Wasser ausgekocht und nochmals abgesaugt. Die vereinigten Filtrate wurden bis auf 2—3 Liter eingedampft und dann nach Kossel's Verfahren²⁾ mit Silbernitrat versetzt, wobei die erforderliche Menge der Silberlösung festgestellt wurde, indem die Entstehung einer gelblich-braunen Fällung bei der Tüpfelprobe mit Barytwasser als Indicator diente.³⁾ Die vom Chlorsilber abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit gepulvertem Barythydrat durch Zerreiben in einem Mörser gesättigt, der entstandene, sehr voluminöse Niederschlag nach seinem Absetzen abfiltrirt, sammt dem Filter mit Wasser

1) Die Testikeln müssen in einem breiten Gefässe frei liegend, nicht in einem Tuche resp. in einer Gaze ausgewaschen werden, da sie sonst sehr schwer von Kochsalz zu befreien sind.

2) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 179.

3) Solche Fällung soll sogleich nach dem Vermischen der zu prüfenden Flüssigkeit mit Barytwasser hervortreten, da eine dunkle Färbung, die nach einiger Zeit entsteht, auch bei Abwesenheit von dem nöthigen Ueberschuss des Silbersalzes durch die Reduction in der alkalischen Flüssigkeit hervorgerufen werden kann.

angerührt, abgesaugt¹⁾ und noch dreimal mit Wasser ausgewaschen, dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die filtrirte Flüssigkeit wurde durch Kohlensäure vom Barythydrat befreit, bis auf 1 Liter eingedampft, filtrirt, mit Salpetersäure neutralisirt und abwechselnd mit Silbernitrat und Ammoniak gefällt,²⁾ solange noch ein Niederschlag sich nach weiterem Zufügen von geringen Mengen dieses oder jenes Reagens bildet. Der entstandene, sehr voluminöse Niederschlag, welcher die Silberverbindungen von Histidin und Thymin enthielt, wurde abgesaugt, das Filtrat mit Salpetersäure schwach angesäuert und auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft, wobei eine Reduction des Silbers statt hatte. Nach dem Erkalten erstarrte die Flüssigkeit strahlig krystallinisch. Die Krystalle wurden abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen: das Filtrat wurde weiter eingedampft und mit 3 Volumen Alkohol + 1 Volumen Aether versetzt, der ausgeschiedene Niederschlag abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen. Das auf diese Weise erhaltene saure Argininsilbernitrat, $C_6H_{14}N_4O_3 \cdot HNO_3 + AgNO_3$, welchem noch reducirtes Silber beigemischt ist, wird noch 2—3 Mal aus möglichst wenig heissem Wasser umkrystallisirt, wobei ein ganz weisses, analysenreines Präparat erhalten wird. Die wässerige Lösung desselben soll sich beim Verdampfen auf dem Wasserbade nicht schwärzen, mit Magnesiumhydrat gekocht kein Ammoniak entwickeln (Abwesenheit von Ammoniumnitrat), mit Silbernitrat und Spuren von Ammoniak versetzt keine Trübung zeigen (Abwesenheit von Histidin) und mit Natronlauge gemischt einen rein weissen, im Ueberschuss des Reagens löslichen Niederschlag (Abwesenheit von überschüssigem Silbernitrat) geben.

1000 gr. feuchte, ausgewaschene Testikeln lieferten 7,7 gr. freies Arginin, als zweimal umkrystallisirtes saures Argininsilbernitrat gewogen.

Ich ziehe es entschieden vor, das Arginin als saures und

1) Es ist rathsam, den Niederschlag zuerst abzufiltriren und dann abzusaugen, sonst werden die Papierporen durch das reducirte Silber bald verstopft.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 192.

nicht als basisches Argininsilbernitrat, $C_6H_{14}N_4O_2 + AgNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$, zu reinigen. Das Umkrystallisiren des letzteren Salzes ist nämlich mit einer viel grösseren Reduction des Silbersalzes verknüpft, welche durch die stark alkalische Reaction der Flüssigkeit begünstigt wird. Um die Reduction möglichst zu vermindern, muss man auf folgende Weise verfahren: die Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade eingedampft und dann erkalten lassen; war die Lösung nicht zu concentrirt, so scheidet sich dabei nur eine geringe weisse, amorphe Fällung¹⁾ aus, welche gerade die Reduction des Silbersalzes am meisten hervorruft, während das basische Argininsilbernitrat erst später krystallisirt. Der Niederschlag von der amorphen Fällung und von dem reducirten Silber wird abfiltrirt und mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen, das Filtrat weiter eingedampft. Das ausgeschiedene Salz wird noch einige Male umkrystallisirt, wobei der beim Verdampfen entstehende schwarze Niederschlag jedes Mal nach dem Erkalten der Flüssigkeit abfiltrirt wird. Das basische Argininsilbernitrat ist aber viel schwieriger frei vom reducirten Silber zu bekommen als das saure Salz.

Die in Folge der beträchtlichen Reduction des Silbersalzes frei werdende Salpetersäure führt einen Theil des basischen Argininsilbernitrats in das saure Salz über, welches in Wasser 12 Mal leichter als jenes Salz löslich ist. So hat z. B. Hedin²⁾ bei der Darstellung des basischen Argininsilbernitrates aus der Mutterlauge desselben das saure Salz bekommen; dergleichen erwies sich das von mir direkt aus dem mit Salpetersäure nicht angesäuerten Filtrate von der Histidinsilberbase dargestellte Salz als ein Gemenge von dem basischen und von dem sauren Argininsilbernitrate:

I. 0,1719 gr. Substanz gaben beim Glühen 0,0470 gr. Ag.

II. 0,1578 gr. Substanz von einer anderen Darstellung hinterliessen beim Glühen 0,0446 gr. Ag.

Gefunden:		Berechnet für:	
I.	II.	$C_6H_{14}N_4O_2 + AgNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + AgNO_3$
Ag 27,34%	28,26%	30,55%	26,50%

¹⁾ Ueber die Natur derselben s. S. 208.

²⁾ S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XX, S. 189.

Um die Verluste in Folge der Bildung von dem leicht löslichen sauren Salze zu vermeiden, muss man die Mutterlauge von dem auskrystallisirten basischen Salze entweder auf das saure Salz verarbeiten oder wiederum in das basische Salz überführen. Versetzt man zu dem letzten Zwecke die Flüssigkeit mit Barytwasser bis zur Bildung einer constanten Trübung und verdampft die filtrirte Lösung zur Krystallisation, so bekommt man wiederum die Reduction beim Erwärmen und die Abscheidung einer amorphen Fällung nach dem Erkalten der Flüssigkeit. Es ist noch zu bemerken, dass die Reduction bei Abwesenheit des überschüssigen Silbernitrats auf Kosten des basischen Argininsilbernitrats selbst vor sich gehen muss. Aus diesen Gründen ist es viel bequemer, das Arginin als saures Argininsilbernitrat zu reinigen, dessen Umkrystallisiren mit einer weit geringeren Reduction des Silbersalzes verknüpft ist.

Das Arginin lässt sich auch als Argininkupfernitrat gut reinigen, wie es die Analysen von verschiedenen Präparaten zeigen, die aus noch unreinen Portionen von Argininnitrat dargestellt und nur einmal krystallisirt werden:

- III. 0,1897 gr. der Substanz 1 lieferten beim Glühen 0,0282 gr. CuO^1 ,
 IV. 0,3811 gr. der Substanz 2 hinterliessen beim Glühen 0,0578 gr. CuO ,
 V. Aus 0,2829 gr. der Substanz 3 resultirten beim Glühen 0,0422 gr. CuO .

Gefunden:

Berechnet für:

	III	IV	V	$(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2)_2 + \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
Cu	11,87%	12,11%	11,91%	11,83%.

Fast alle von mir untersuchten Argininverbindungen wurden aus dem sauren Argininsilbernitrat dargestellt, dessen vollkommene Reinheit durch die Reactionen und durch die Analysen bewiesen wurde. Einige Verbindungen wurden aus dem ebenfalls reinen Argininkupfernitrat erhalten. Das Argininchlorid wurde als solches durch mehrmalige Krystallisation gereinigt.

Arginin, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$, wurde aus dem reinen sauren Argininsilbernitrat durch die Ueberführung desselben in das

¹⁾ Die Substanzen für die Analysen III—V wurden bei 105 bis 110° getrocknet. Das Kupferoxyd wurde bis zur Gewichtsconstanz ausgeglüht.

Argininsilber und durch die Zersetzung der Silberbase mit Schwefelwasserstoff dargestellt; die filtrirte und zum dünnen Syrup verdampfte Flüssigkeit fing nach dem Erkalten räsich zu krystallisiren an. Die Krystalle bildeten rosettenartige Drusen von rechtwinkeligen oder zugespitzten Tafeln und dünnen Prismen. Sie wurden abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen. Die erhaltene Substanz hatte einen scharfen Zersetzungspunkt, der bei $207\text{--}207,5^\circ$ lag.¹⁾ Das Arginin hat einen schwach bitterlichen Geschmack und keinen Geruch. Es verhält sich wie ein Alkali: es reagirt stark alkalisch und zieht aus der Luft Kohlensäure an, welche beim wiederholten Verdampfen der Lösungen wiederum entweicht;²⁾ es fällt die Oxyde aus den Lösungen der Salze von schweren Metallen: Silberoxyd löst sich in der Kälte in Argininlösung entweder gar nicht oder sehr schwierig; aus Ammoniaksalzen wird Ammoniak durch das Arginin schon in der Kälte ausgetrieben. In Wasser ist Arginin leicht löslich, in kochendem Alkohol dagegen fast unlöslich.

Mit Hülfe der Raoult'schen Gefriermethode habe ich das Molekulargewicht des Arginins bestimmt. Die Substanz wurde bei 110° getrocknet, wobei sie sich als vollkommen frei von Kohlensäure (die Prüfung mit Barytwasser) erwies. Als Lösungsmittel wurde Wasser genommen.³⁾

g	Δ	M
0,47%	0,065°	137
1,77%	0,202°	166
3,78%	0,402°	178
6,07%	0,620°	185
M (für $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ berechnet) = 174.		

1) Alle Temperaturangaben sind corrigirt.

2) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 184.

3) Die Temperatur der Kühlflüssigkeit war -6° , die der Luft $+3^\circ$. Um den Zutritt der Kohlensäure aus der Luft zu verhindern, wurde die kugelförmige Schutzvorrichtung des Apparates mit Kalilauge gefüllt und das gerade Rohr derselben mit einem mit Glasstab verschlossenen Kautschukschlauche verbunden, mittelst dessen der Rührer bewegt wurde.

Diese Bestimmungen zeigen somit unzweideutig, dass dem Arginin die Molekularformel $C_6H_{14}N_4O_2$ zukommt. Der zu niedrige im ersten Versuche gefundene Werth für das Molekulargewicht konnte sowohl durch den von der absolut kleinen Temperaturerniedrigung herrührenden Fehler, wie auch durch die elektrolytische Dissociation verursacht werden. Das geringe Steigen des für das Molekulargewicht gefundenen Werthes mit der zunehmenden Concentration der Lösung ist eine häufig zu beobachtende Erscheinung.

Argininchlorid, $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + H_2O$, wurde durch einmaliges Umkrystallisiren aus Wasser und durch viermal wiederholte Krystallisation aus heissem verdünnten Alkohol gereinigt. In heissem 85%igem Alkohol ist das Salz merkwürdiger Weise schwerer löslich als in kaltem: löst man Argininchlorid in wenig Wasser und fügt so viel Alkohol hinzu, dass der Gehalt an Alkohol etwa 85% ausmacht, so wird bei genügender Concentration der Salzlösung die in der Kälte durchsichtige Flüssigkeit beim Erwärmen bald trüb und scheidet eine ölartige Schicht aus, die nach dem Erkalten und Umrühren wieder verschwindet, um beim Erwärmen aufs Neue zu entstehen: dieser Versuch lässt sich beliebig oft wiederholen. Möglicher Weise wird diese Erscheinung durch den Uebergang des krystallwasserhaltigen Salzes beim Erwärmen mit Alkohol in das krystallwasserfreie bedingt. Löst man das Argininchlorid in wenig heissem Wasser oder heissem verdünnten (etwa 75%) Alkohol und setzt der Lösung 95% Alkohol bis zur Ausscheidung einer ölartigen Schicht hinzu, so erscheinen nach einiger Zeit gut ausgebildete rosettenartige Drusen von tafelförmigen Krystallen: die Krystallisation kann durch Hinzufügen von Aether beschleunigt werden. Aus Alkohol lässt sich das Argininchlorid viel bequemer umkrystallisiren als aus Wasser, worin es sehr leicht löslich ist und woraus es, wenigstens aus den noch nicht reinen Lösungen, sehr langsam krystallisirt.

Das von mir untersuchte Argininchlorid enthielt ein Molekül Krystallwasser:

VI. 1.9095 gr. der lufttrockenen Substanz verloren bei 140° 0,1577 gr. an Gewicht.

VII. 5,3819 gr. der lufttrockenen Substanz von einer anderen Bereitung nahmen bei 135° ¹⁾ 0,4341 gr. an Gewicht ab.

Gefunden:			Berechnet für:
	VI.	VII.	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + H_2O$
H ₂ O	8,26%	8,07%	7,88%

Das von Schulze und Steiger²⁾ untersuchte φ -Argininchlorid enthielt kein Krystallwasser, während Hedin³⁾ in seinem aus den Spaltungsprodukten von Horn erhaltenen Argininchlorid ein Molekül Krystallwasser gefunden hat. Um sicher zu sein, dass der Gewichtsverlust in meinen Beobachtungen nicht durch die Verflüchtigung von Salzsäure resp. von Krystallalkohol bedingt wurde, habe ich folgende Analysen gemacht:

VIII. 0,0928 gr. der lufttrockenen Substanz 2 lieferten beim Verbrennen mit Bleichromat und vorgelegten Kupfer- und Silberspiralen 0,1073 gr. CO₂ und 0,0674 gr. H₂O.

IX. 0,1835 gr. derselben Substanz gaben 0,1167 gr. AgCl.

X. Aus 0,1263 gr. der bei 135° getrockneten Substanz 2 wurden 0,0872 gr. AgCl erhalten.

XI. 0,2217 der bei 140° getrockneten Substanz 1 gaben 0,1507 gr. AgCl.

Gefunden:			Berechnet für:	
	VIII	IX	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + H_2O$	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + \frac{1}{2} C_2H_5 \cdot OH$
C	31,54%	—	31,49%	35,94%
H	8,13%	—	7,49%	7,76%
Cl	—	15,72%	15,50%	15,16%
	X	XI	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	
Cl	17,07%	16,81%	16,82%	

Das krystallwasserfreie Salz hat keinen scharfen Schmelzpunkt: es sintert sehr stark bei etwa 208° zusammen, bei 209° fangen die Gasbläschen zu entweichen an, und gleichzeitig, oder einige Grade höher, schmilzt die Substanz unter Zersetzung.

Ich habe das spezifische Drehungsvermögen von Arginin-

¹⁾ In beiden Fällen wurde die Substanz, um das Schmelzen in ihrem Krystallwasser zu vermeiden, zuerst einige Tage im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet, wobei sie einen Theil des Wassers verlor, und dann bei 120°, später bei 135—140° entwässert. Die Substanz ist etwas hygroskopisch.

²⁾ E. Schulze und E. Steiger, Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 52.

³⁾ S. G. Hedin, ibid., Bd. XXI, S. 156.

chlorid und die Einwirkung von Salzsäure und Barythydrat auf dasselbe untersucht. Die Polarisationsuntersuchungen wurden mit dem grossen Lippich'schen Halbschattenpolarimeter mit dreitheiligem Gesichtsfeld ausgeführt, welcher mir von Herrn Geheimrath Prof. Th. Zincke gütigst zur Verfügung gestellt wurde; es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrath Zincke für seine freundliche Erlaubniss, diesen ausgezeichneten Apparat zu benutzen, meinen besten Dank auszudrücken. Die Resultate der Beobachtungen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Beobacht.	Anzahl der Molek. HCl auf 1 Mol. $C_{12}H_{11}O_2$ HCl.	l	t°	p	d _t	c (berechnet)	α	[α] _D für	
								$C_{12}H_{11}O_2 \cdot HCl$	$C_{12}H_{11}O_2$
1	0	2	20,5°	16,846 %	1,0556	17,782 %	+ 3,6°	+ 10,0	+ 12,1
2	0	2	20°	9,303 %	1,0297	9,579 %	+ 2,05°	+ 10,70	+ 12,94
3	1	2	20°	9,217 %	1,0345	9,535 %	+ 3,76°	+ 19,72	+ 23,85
4	2	2	20°	6,332 %	1,0284	6,512 %	+ 2,74°	+ 21,04	+ 25,44
5	6 $\frac{3}{4}$	2	20°	4,278 %	1,0355	4,480 %	+ 1,88°	+ 21,22	+ 25,66
6	6 $\frac{3}{4}$	2	30°	4,278 %	1,0326	4,417 %	+ 1,85°	+ 20,94	+ 25,32
7	6 $\frac{3}{4}$	2	50°	4,278 %	1,0243	4,382 %	+ 1,83°	+ 20,88	+ 25,25
8	13 $\frac{1}{2}$	2	20°	4,206 %	1,0593	4,455 %	+ 1,90°	+ 21,32	+ 25,78
9	13 $\frac{1}{2}$	4	20°	2,450 %	1,0338	2,533 %	+ 2,15°	+ 21,22	+ 25,66
10	25	4	20°	1,240 %	1,0283	1,275 %	+ 1,06°	+ 20,78	+ 25,13

Der Lösung 2 wurde dann so viel Barythydrat hinzugefügt, dass nach Verbindung desselben mit der Salzsäure des Argininchlorids noch $\frac{3}{4}$ Molekül $Ba(OH)_2$ übrig bleiben sollte. Die Flüssigkeit wurde nach 20 Minuten (11), nach 3 Stunden (12) und nach 24 Stunden (13) polarisirt; dann wurde sie in einem luftdicht zugeschlossenen Kolben im kochenden Wasserbade erwärmt, wobei eine ganz deutliche Entwicklung von alkalischen Dämpfen zu constatiren war. Nach dem Polarisiren (14) wurde die alkalische Flüssigkeit mit einem Ueberschuss

1, Die Eigenschaften dieser concentrirten Lösung gestatteten keine genauere Beobachtung, während bei allen übrigen Versuchen die einzelnen Ablesungen höchstens um 0,03° unter einander differirten.

von Salzsäure übersättigt, so dass 8 Moleküle freier Salzsäure in der Lösung vorhanden waren, und wiederum polarisirt (15):

Beobacht.	l.	p ¹⁾	d ₄ ²⁾	c ¹⁾ (berechnet)	α	$[\alpha]_D^{20}$ für C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₄
11	4	3,472 ‰	1,0509	3,649 ‰	+ 1,66°	+ 11,37
12	2	3,472 ‰	1,0509	3,649 ‰	+ 0,83°	+ 11,37
13	2	3,472 ‰	1,0509	3,649 ‰	+ 0,85°	+ 11,65
14	2	3,475 ‰	1,0513	3,653 ‰	+ 0,85°	+ 11,63
15	4	2,565 ‰	1,0662	2,735 ‰	+ 2,72°	+ 24,86

Ueberblickt man die beim Polarisiren gewonnenen Resultate, so kann man daraus folgende Schlüsse ziehen:

1. Das von mir untersuchte Argininchlorid ist jedenfalls mit dem von Schulze und Steiger²⁾ aus Pflanzen dargestellten Argininchlorid nicht identisch, da für dieses das spezifische Drehungsvermögen von den Verfassern gleich + 33,13 angegeben ist (auf Arginin berechnet: + 40,05), während ich $[\alpha]_D = + 10,70$ (2), also fast genau dreimal weniger gefunden habe.

2. Das ζ -Argininchlorid ist in wässerigen Lösungen stark hydrolytisch dissociirt, wie es aus der bedeutenden Erhöhung seines Drehungsvermögens unter der Einwirkung von Salzsäure, wie auch aus dem geringen Herabsetzen desselben unter dem Einfluss von Barythydrat zu schliessen ist.

3. Bei dem Gehalt an 7 Molekülen freier Salzsäure (möglicher Weise schon bei einem niedrigeren Gehalt an derselben) auf 1 Molekül α -Argininchlorid wird sein spezifisches Drehungsvermögen constant. Aus den Beobachtungen 5, 8 und 9³⁾ ist für die wässerigen, einen genügenden Ueber-

1) Für freies Arginin angegeben.

2) E. Schulze und E. Steiger, l. c., S. 53.

3) Der Versuch 10 ist ausgeschlossen, da hier in Folge des relativ geringen absoluten Werthes von α ein Fehler bei der Ablesung von nur $\pm 0,01^\circ$ für den Werth von $[\alpha]_D$ schon einen Ausschlag von $\pm 0,2$ macht.

schuss der Salzsäure enthaltenden Lösungen von α -Argininchlorid $[\alpha]_D^{20} = + 21,25$ berechnet.

4. Die Reaction des α -Argininchlorids mit Barytwasser wird in einem kurzen Zeitraum beendigt (11—13). Die geringen, bei diesen Beobachtungen gefundenen Unterschiede sind wohl auf eine leichte Trübung der Lösung durch Baryumcarbonat zurückzuführen.

5. Die Zersetzung, welche α -Argininchlorid beim Erwärmen mit Barytwasser während 10 Minuten erleidet, ist sehr gering (14—15).

6. Der Einfluss der Temperatur auf das spezifische Drehungsvermögen des α -Argininchlorids ist, wenn er überhaupt existirt, zwischen 20—50° sehr gering (5—7).

Argininnitrat, $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$, wurde durch Zersetzen von reinem basischen Argininsilbernitrat resp. von Argininkupfernitrat dargestellt. Die heissen, genügend concentrirten, wässerigen Lösungen von reinem Argininnitrat krystallisiren nach dem Erkalten sehr leicht und bis zum letzten Tropfen, indem sie Aggregate von den undurchsichtigen, kreideartigen Scheiben ausscheiden, deren Ränder meistens stark nach innen gebogen sind; diese Scheiben sind durch Drusen von mikroskopischen Nadeln gebildet und effloresciren häufig sehr stark; beim Beginnen der Krystallisation bilden sich in der syrupartigen Flüssigkeit undurchsichtige Punkte, die den Colonien von gewissen Mikroorganismen ungemein ähnlich sind. Zur Reinigung des unreinen Argininnitrats ist sein Umkrystallisiren aus wässerigen Lösungen wenig geeignet und gelingt viel leichter bei der Krystallisation des Salzes aus heissem verdünnten (etwa 85%) Alkohol.

Das Argininnitrat enthält $\frac{1}{2}$ Molekül Krystallwasser:

- XII. 2,5752 gr. der lufttrockenen Substanz 1 nahmen bei 115° 0,1061 gr. an Gewicht ab.
 XIII. 2,3140 gr. der über Schwefelsäure getrockneten Substanz 2 verloren bei 115° 0,0854 gr. an Gewicht.

Gefunden:		Berechnet für:	
	XII.	XIII.	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$
H ₂ O	4,12%	3,69%	3,66%

Das von Schulze und Steiger¹⁾ und von Hedin²⁾ untersuchte Argininnitrat enthielt ebenfalls $\frac{1}{2}$ Molekül Krystallwasser.

Das Salz ist etwas hygroskopisch; die lufttrockene Substanz enthält 0,3—1,0% hygroskopisches Wasser. Wurde das krystallwasserhaltige Salz nicht vorher längere Zeit bei 85° getrocknet, so backt es beim Erwärmen über 100° zusammen.

Das wasserfreie Salz hat keinen scharfen Schmelzpunkt und bildet bei etwa 175° eine trübe, halbgeschmolzene Masse, die eine Menge von Gasbläschen enthält.

Das Argininnitrat ist nach Hedin³⁾ bei 15° in 2 Theilen Wasser löslich. Es löst sich leicht in heissem, schwer in kaltem 85° Alkohol. Die wässerigen Lösungen von Argininnitrat reagiren neutral oder höchstens kaum bemerkbar sauer. Verdampft man eine wässrige Lösung des Argininnitrates mit Baryumcarbonat, so bildet sich theilweise freies Arginin resp. dessen Carbonat.

Die Bestimmungen des specifischen Drehungsvermögens gaben folgende Resultate:

Beobacht.	Anzahl der Moleküle HNO ₃ auf 1 Molekül C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ · H ₂ O	l.	p	d ₄ ²⁰	c (berechnet)	α	[α] _D ²⁰ für	
							C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ · H ₂ O	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂
16	0	2	9,863 %	1,0348	10,206 %	+ 1,90°	+ 9,31	+ 12,68
17	0	6	1,781 %	1,0047	1,789 %	+ 1,14°	+ 10,62	+ 14,46
18	4	2	5,214 %	1,0457	5,452 %	+ 2,04°	+ 18,71	+ 25,48

Von Schulze und Steiger (l. c., S. 51) ist das specifische Drehungsvermögen für das φ-Argininnitrat gleich + 28,75 angegeben. Also hat auch das ζ-Argininnitrat ein fast genau dreimal geringeres Drehungsvermögen als das φ-Argininnitrat. Durch die Salpetersäure wird sein Drehungsvermögen stark erhöht.

Saures Argininnitrat, C₆H₁₄N₄O₂ · 2HNO₃, wurde durch

1) E. Schulze und F. Steiger, Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 48.

2) S. G. Hedin, ibid., Bd. XX, S. 191, Bd. XXI, S. 156.

3) S. G. Hedin, ibid., Bd. XXI, S. 156.

das Verdampfen einer Lösung von reinem Argininnitrat, die einen grossen Ueberschuss von Salpetersäure enthielt, im Vacuum dargestellt: die überschüssige Salpetersäure wurde im Vacuum über festem Kalihydrat ausgetrieben und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet. Die auf diese Weise erhaltene Substanz krystallisirt entweder in langen farblosen Nadeln der Angabe von Hedin (l. c.) entsprechend, oder in warzenförmigen, durchsichtigen Drusen, oder stark glänzenden, schuppenartigen Massen von mikroskopischen, äusserst dünnen, verlängerten und zugespitzten Täfelchen.

XIV. 0,1635 gr. Substanz gaben 39,3 ccm. feuchten N (9.5° ; 732,5 mm. Bar.).

Gefunden:

Berechnet für:

XIV.

$C_6H_{14}N_4O_3 \cdot 2HNO_3$

N 27.79%¹⁾

28,04%

Das Salz schmilzt unter Zersetzung bei $144,5-145^{\circ}$.

Argininsulfat, $(C_6H_{14}N_4O_3)_2 \cdot H_2SO_4$, wurde aus reinem Argininkupfersulfat durch Zerlegen mit Schwefelwasserstoff dargestellt. Ebenso wenig wie Schulze und Steiger (l. c., S. 55) und Hedin (l. c., S. 157), gelang es mir, dieses Salz zur Krystallisation zu bringen.²⁾ Die wässerigen, concentrirten Lösungen zeigten keine Neigung zum Krystallisiren; die Lösungen in heissem, 85%igem Alkohol, worin das Salz sehr schwer löslich ist, und die heissen, wässerigen Lösungen, zu denen Alkohol bis zur constanten Trübung zugesetzt wurde, schieden nach Erkalten eine ölartige Schicht ab, krystallisirten aber selbst nach längerem Stehen und nach Zusatz von Aether nicht. Das ausgeschiedene Oel wurde mit Alkohol ausgewaschen und bei 130° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet.

1) Ein kleines Minus an N ist vermuthlich dadurch bedingt, dass eine geringe Menge von Salpetersäure durch die Kupferspirale nicht reducirt wird. Auch Argininnitrat, $C_6H_{14}N_4O_3 \cdot HNO_3$, gibt nach Schulze und Steiger (l. c.) etwas weniger N.

2) Bei A. Gamgee (Die physiologische Chemie der Verdauung. Deutsche Ausgabe von L. Asher und H. R. Beyer. 1897. Leipzig und Wien. S. 273.) ist angegeben, dass das Argininsulfat, $(C_6H_{14}N_4O_3)_2 \cdot H_2SO_4 + 2\frac{1}{2}H_2O$, ein mikrokrySTALLINISCHES Pulver darstellt und alles Krystallwasser bei 110° verliert, doch ist die Quelle dieser Angabe nicht ersichtlich.

Die trockene Substanz ist hygroskopisch; ihre wässrige Lösung reagiert kaum sauer.

Die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens lieferte folgende Resultate:

Beobacht.	Anzahl von Mol. H_2SO_4 auf 1 Mol. $(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot H_2SO_4$	l	p	d_4^{20}	c berechnet	α	$[\alpha]_D^{20}$ für	
							$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot H_2SO_4$	$C_6H_{14}N_4O_2$
19	0	2	11,224 °	1,0441	11,719 %	+ 1,93 °	+ 8,23	+ 10,55
20	0	2	4,892 °	1,0182	4,981 %	+ 0,87 °	+ 8,73	+ 11,19
21	1	4	3,166 °	1,0156	3,215 %	+ 1,93 °	+ 15,01	+ 19,24
22	6 $\frac{3}{4}$	4	2,253 °	1,0307	2,322 %	+ 1,62 °	+ 17,44	+ 22,35

Diese Beobachtungen zeigen somit, dass auch beim α -Argininsulfat ein Zusatz von der Säure eine bedeutende Zunahme des spezifischen Drehungsvermögens bewirkt. Während bei dem α -Argininchlorid und bei dem α -Argininnitrat $[\alpha]_D$ auf freies Arginin berechnet fast dasselbe ist, wurde es für das α -Argininsulfat merklich geringer gefunden. Bei der Verdünnung der Lösungen von α -Argininsalzen zeigte sich in geringem Maasse eine Erhöhung des spezifischen Drehungsvermögens. (19—20, 16—17, 1—2). Eine Multirotation wurde bei dem α -Argininsulfat nicht beobachtet.

Argininphosphorwolframat, $(C_6H_{14}N_4O_2)_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 24WO_3 + 10H_2O$, wurde durch Vermischen der Lösungen von reinem Argininnitrat und von reiner, nach Winterstein's¹⁾ Verfahren dargestellter und zweimal krystallisirter Phosphorwolframsäure erhalten. Der pulverige Niederschlag wurde abgesaugt und aus kochendem Wasser, worin das Salz ziemlich löslich ist, umkrystallisirt. Die nach Erkalten ausgeschiedenen, sehr kleinen Prismen, die sich beim Erhitzen, ohne zu schmelzen, zersetzten, wurden analysirt:

XV. 4,9526 gr. der lufttrockenen Substanz verloren bei 115° 0,1450 gr. an Gewicht.

Gefunden:		Berechnet für:
XV		$(C_6H_{14}N_4O_2)_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 24WO_3 + 10H_2O$
H_2O	2,93 %	2,79 %.

1) E. Winterstein, Chem. Zeit., 1898, 54.

- XVI. 1,1448 gr. der bei 115° getrockneten Substanz gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,1461 gr. CO₂ und 0,0931 gr. H₂O.
 XVII. 1,4396 gr. derselben Substanz lieferten 35,4 ccm. feuchten N (10°; 733 mm. Bar.).

	Gefunden:		Berechnet für:
	XVI	XVII	(C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₄) ₃ · 2H ₂ PO ₄ · 24WO ₃
C	3,48%	—	3,44%
H	0,91%	—	0,74% ¹⁾
N	—	2,84%	2,68%.

Somit enthält das wasserfreie Salz 8,32% Arginin und 91,68% Phosphorwolframsäure. Bei der Fällung der Argininsalze durch die Phosphorwolframsäure wird in concentrirten Lösungen 12—14 mal so viel Reagens verbraucht, als Arginin in der Lösung vorhanden ist. Die Zusammensetzung des Argininphosphorwolframats kann vermuthlich eine andere sein, wenn die Bedingungen der Fällung andere sind, besonders wenn eine Mineralsäure zugegen ist; in diesem letzteren Falle scheidet sich ein käsiger Niederschlag aus, der beim Stehen deutlich krystallinisch wird. Mischt man eine Lösung von einem Argininsalz auf einmal mit einer grösseren Menge von einer concentrirten Lösung der Phosphorwolframsäure, so bildet sich eine ganz schleimartige, fadenziehende Masse, die sich beim anhaltenden Umrühren in den käsigen Niederschlag umwandelt. In einem grossen Ueberschuss von Phosphorwolframsäure löst sich der Niederschlag von Argininphosphorwolframat vollkommen.

Um die Löslichkeitsverhältnisse dieses Salzes zu untersuchen, habe ich folgende Versuche gemacht. Ich habe 5 Portionen einer Lösung von Argininnitrat genommen, die in je 500 ccm. je 0,103 gr. Arginin enthielten; in der Portion I war keine Schwefelsäure, in II waren 2,5% H₂SO₄, in III und IV 5% H₂SO₄, in V 7% H₂SO₄ zugegen; die Portion VI

1) Unter der Annahme berechnet, dass das Wolframmetaphosphat sich beim Verbrennen des Salzes bildet; entsteht dabei Wolframpyrophosphat, so soll der beim Verbrennen der Substanz gefundene Wasserstoffgehalt gleich 0,71% sein.

enthielt 0,095 gr. Arginin in 500 ccm. 5%iger Schwefelsäure gelöst. Zu jeder Portion, ausser der letzten, wurden je 9 ccm., zu VI 30 ccm. einer Lösung von Phosphorwolframsäure (1:4) hinzugefügt. Aus I fiel sogleich ein pulveriger Niederschlag aus, in II bildete sich eine starke Trübung, aus VI begann nach einigen Minuten die Ausscheidung eines krystallinischen Niederschlages, während III—V nur ein ganz geringes Opalisiren zeigten: nach 24 Stunden war in I ein pulveriger, in II ein zum Theil krystallinischer, in VI ein schön krystallinischer Niederschlag, in III—V waren aber nur einige kaum bemerkbare Flöckchen vorhanden. Dann wurden zu I und II je 10 ccm., zu III 9 ccm. der Phosphorwolframsäurelösung zugesetzt, wodurch in I ein geringer pulveriger,¹⁾ in II ein geringer krystallinischer Niederschlag wiederum entstand, und auch III jetzt eine schön krystallinische Fällung gab: ein weiterer Zusatz von Phosphorwolframsäure bewirkte keine Fällung mehr, und nur in II bildete sich, als dazu noch 10 ccm. des Reagens hinzugefügt wurden, ein kaum bemerklicher krystallinischer Niederschlag. Nach Zusatz von je 0,025 gr. Arginin (als Argininchlorid genommen) zu IV und V entstanden krystallinische Niederschläge; nach 24 Stunden wurde V mit weiteren 21 ccm. der Phosphorwolframsäurelösung gemischt, wodurch die Menge des Niederschlages noch etwas vermehrt wurde.

Diese Versuche zeigen, dass man, um das Arginin durch Phosphorwolframsäure auszufällen, einen gewissen Ueberschuss des Reagens verwenden muss, so dass der Gehalt der Flüssigkeit an freier Phosphorwolframsäure mindestens $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ % betrage.²⁾ Bei einem gleichen geringen Ueberschuss von Phosphorwolframsäure in der Flüssigkeit ist der Niederschlag von Argininphosphorwolframat bei Gegenwart von Schwefelsäure merklich leichter löslich als in reinem Wasser, doch kann die

1) Der Zusatz von nur 1 ccm. des Reagens rief keine Fällung hervor.

2) Andererseits aber darf dieser Ueberschuss nicht übermässig gross sein, da das Argininphosphorwolframat sich in einem grossen Ueberschuss der Phosphorwolframsäure, wie schon früher gesagt, vollständig löst.

Löslichkeit des Salzes in verdünnter Schwefelsäure durch einen weiteren Zusatz von Phosphorwolframsäure bedeutend vermindert werden.

Um den Grad der Löslichkeit des Argininphosphorwolframats bei verschiedenem Gehalt der Lösung an Schwefelsäure und an Phosphorwolframsäure zu bestimmen, habe ich auch folgende Versuche gemacht: nachdem ich die oben erwähnten Mischungen I—VI 48 Stunden nach der Bildung von jedem letzten Niederschlage stehen lassen hatte, habe ich sie filtrirt, von den Filtraten ein abgemessenes Volumen genommen und darin den Stickstoffgehalt bestimmt. Die Analyse wurde ausgeführt nach folgendem mir von Prof. Kossel mitgetheilten Verfahren, welches im hiesigen Institute zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl bei Gegenwart von Phosphorwolframsäure ausgearbeitet ist: die Flüssigkeiten wurden zuerst in einer Schale (I unter Zusatz von Schwefelsäure), dann in einem Kjeldahl'schen Kolben verdampft (zu I und II wurde so viel Schwefelsäure zugesetzt, dass in der Flüssigkeit 15 bis 20 ccm. 100%iger Säure waren). Als die Flüssigkeit in Folge der Ausscheidung eines krystallinischen Niederschlages zu stossen anfang, wurden dazu 10 gr. Kaliumsulfat und 1 gr. Kupfersulfat hinzugefügt; es schied sich sogleich ein pulveriger Niederschlag ab, und die Flüssigkeit siedete jetzt ruhig; die gebildete gelbe Kruste, die den Wänden des Gefässes fest anhaftete, wurde durch direktes Erhitzen mit freier Flamme möglichst entfernt. Nach beendigter Oxydation wurde die Mischung mit Wasser verdünnt, die Wolframsäure durch Zink reducirt und die mit Kalilauge stark alkalisch gemachte Flüssigkeit nach Zusatz von Talk und von einem Stückchen Zink wie gewöhnlich abdestillirt. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt. In Folge der nicht unbedeutenden Schwierigkeiten, mit denen die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl bei Gegenwart von grossen Mengen der Phosphorwolframsäure verknüpft waren, darf ich den Resultaten dieser Versuche nur eine approximative Bedeutung beimessen.

Mischung	Arginin in 1 Liter vor der Fällung	Phosphor- wolframsäure (1:4) auf 1 Liter zugefügt	Schwefelsäure in 1 Liter der Mischung	$\frac{1}{10}$ norm. NaOH, die bei der Titration ver- braucht wurden (f. 200 ccm. d. Filtrates)	Arginin in 1 Liter des Filtrates gelöst geblieben
I	0,206 gr.	38 ccm.	—	7,9 ccm.	0,069 gr.
II	0,206 »	58 »	25 gr.	8,7 »	0,076 »
III	0,206 »	36 »	50 »	13,5 »	0,118 »
IV	0,256 »	18 »	50 »	23,0 »	0,201 » ¹⁾
V	0,256 »	60 »	70 »	7,2 »	0,063 »
VI	0,190 »	60 »	50 »	8,2 »	0,071 »

Bei der Fällung von Arginin durch Phosphorwolframsäure in wässrigen oder schwefelsauren Lösungen bleiben somit, bei einem genügenden Ueberschuss²⁾ des Reagens, etwa 0,07 gr. Arginin in 1 Liter Flüssigkeit gelöst: ist aber die Menge der vorhandenen überschüssigen Phosphorwolframsäure ungenügend, so wird die Löslichkeit des Argininphosphorwolframats merklich erhöht, und in einer schwefelsauren Lösung können dabei, wie es auch oben (S. 194) angezeigt wurde, sogar etwa 0,2 gr. Arginin in 1 Liter Lösung bleiben.

Argininkupfernitrat, $(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu(NO_3)_2 + 3\frac{1}{2}H_2O$, wurde durch Kochen der Lösung von reinem Argininnitrat mit Kupfercarbonat und durch zweimalige Krystallisation des gebildeten Salzes aus heissem Wasser gewonnen. Dieses Salz krystallisiert in kugelförmigen, sehr schönen Aggregaten von dunkelblauen Nadeln oder dünnen zugespitzten Prismen. Stellt man aber das Argininkupfernitrat aus unreinem Arginin dar, so krystallisieren die Lösungen des Salzes nicht immer, und es bildet sich bisweilen ein Syrup, der beim Vermischen und Umrühren mit wenig kaltem Wasser einen reichlichen Niederschlag von Argininkupfernitrat abscheidet. Die Lösungen des Salzes reagieren alkalisch.

1) Die Menge des in der Lösung gebliebenen Arginins war vielleicht noch etwas grösser, da der Kolben zu Ende der Destillation zersprang.

2) Für die Bildung des Salzes mit 0,2 gr. Arginin sind etwa 10 ccm. der oben erwähnten Lösung der Phosphorwolframsäure nothwendig.

1 Theil des Salzes löst sich bei 13° in 95,5 Theilen Wasser, oder 100 Theile Wasser lösen 1,05 Theile Salz:

XVIII. 28.375 gr. Lösung hinterliessen 0,2942 gr. des bei 110° getrockneten Rückstandes.

Argininkupfernitrat enthält 3 1/2 Mol. Krystallwasser, welches es schon über Schwefelsäure langsam verliert:

XIX. 0.5478 gr. der lufttrockenen Substanz nahmen bei 105° 0,0572 gr. an Gewicht ab.

XX. 3.4798 gr. der lufttrockenen Substanz von einer anderen Darstellung verloren bei 105—110° 0,3590 gr. an Gewicht.

XXI. 0,3691 gr. der entwässerten Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0546 gr. CuO.

XXII. 0.2942 gr. der entwässerten Substanz gaben beim Glühen 0,0418 gr. CuO.

		Berechnet für:	
Gefunden:		$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu(NO_3)_2$	$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu(NO_3)_2$
		+ 3 1/2 H ₂ O	+ 3 H ₂ O
H ₂ O	XIX XX	10,52%	9,16%
	XXI XXII		
Cu	11,81% 11,35%	$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu(NO_3)_2$	11,83%

Nach Schulze und Steiger¹⁾ und Hedin²⁾ enthält das Argininkupfernitrat 3 Mol. Krystallwasser.

War das Salz vorher längere Zeit über Schwefelsäure oder einige Stunden bei 85° nicht getrocknet, so sintert es bei 100° in seinem Krystallwasser zusammen. Das krystallwasserhaltige Salz schmilzt im Capillarröhrchen bei 112—114° in seinem Krystallwasser. Das entwässerte Salz schmilzt unter starker Zersetzung bei 232—234°.

Argininkupfersulfat hat nach Schulze und Steiger (l. c., S. 55) die Zusammensetzung: $(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot CuSO_4 + 5 1/2 H_2O$ und verliert bei 150° fast alles Krystallwasser ohne Zersetzung; bei 170° wird es schon zersetzt.

Das von mir aus reinem Argininsulfat durch Kochen mit Kupferoxydhydrat bereitete Salz krystallisirte dem Argininkupfernitrat ähnlich, doch haben die Krystalle von Arginin-

1) E. Schulze und E. Steiger, Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 52.

2) S. G. Hedin, ibidem, Bd. XX, S. 191.

kupfersulfat eine hellere Farbe. Die Lösungen von diesem Salze bleiben leicht in hohem Grade übersättigt.

Das krystallwasserhaltige Salz schmilzt bei etwa 110° . Der Zersetzungspunkt von dem entwässerten Salze liegt bei $235 - 238^{\circ}$.

Argininquecksilberchlorid. Beim Versetzen von einer Lösung des Arginins mit einer Lösung von Quecksilberchlorid bis zu schwach saurer Reaction wurde ein sehr voluminöser, weisser, amorpher Niederschlag erhalten, der sich in Säuren, sogar in Essigsäure, und in heissem Wasser leicht löste. Nach Absaugen und Auswaschen mit Wasser wurde dieser Niederschlag sogar in kochendem Wasser äusserst schwer löslich; es ist möglich, dass die anfängliche leichte Löslichkeit desselben in heissem Wasser durch die Gegenwart von Quecksilberchlorid bedingt wurde. Bei der Behandlung mit viel kochendem Wasser wurde fast alles gelöst; es blieb nur ein geringer gelblicher Rückstand. Beim Erkalten schied sich bald eine starke Trübung, die sich zum Theil als ein Niederschlag zu Boden setzte, zum Theil suspendirt blieb; die Trübung und sogar ein Theil des Niederschlages gingen beim Filtriren durch das Filtrum.

Die geringe Menge des gesammelten Niederschlages wurde im Vacuum getrocknet und analysirt.

XXIII. 0,3213 der im Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure gelösten Substanz wurden in der Kälte durch Schwefelwasserstoffstrom zersetzt; es resultirten 0,2478 HgS bei 105° getrocknet. Aus dem mit CaCO_3 eingedampften Filtrate von HgS wurden 0,1461 AgCl erhalten.

Gefunden:

XXIII.

Hg 66,49 %

Cl 11,24 %.

Das Verhältniss von Hg : Cl ist 1,04 : 1 gleich. Aus Mangel an Substanz konnte ich leider keine weiteren Analysen ausführen. Jedenfalls aber war die analysirte Substanz kein einfaches Doppelsalz von Arginin und Quecksilberchlorid, wo $\text{Hg} : \text{Cl} = 1 : 2$ sich verhalten müsste; man muss vielmehr annehmen, dass ein Theil des Quecksilbers im Arginin Wasser-

stoff vertritt. Auch die äusserst geringe Löslichkeit der Verbindung in kochendem Wasser zeigt, dass hier kein einfaches Doppelsalz, sondern eine Quecksilberbase vorhanden ist, die der weiter beschriebenen Argininsilberbase und den Quecksilberverbindungen des Harnstoffs gewissermassen analog ist. Das Entstehen von einer Quecksilberbase, welche unter Zersetzung von Quecksilberchlorid durch Arginin vor sich gehen soll, ist in Anbetracht der stark basischen Eigenschaften des Arginins wohl möglich.

Die analysirte Verbindung zersetzte sich unter Schmelzen bei 186—189°.

Saures Argininsilbernitrat, $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + AgNO_3$,¹⁾ krystallisirt beim langsamen Verdunsten seiner wässerigen Lösungen in gut ausgebildeten, nadelförmigen, farblosen, durchsichtigen, schief abgeschnittenen Prismen, die bis zu 4 cm. lang und gewöhnlich büschelförmig gruppirt sind; beim Erkalten der heissen gesättigten Lösungen erstarren sie in mehrere strahlige, weisse, undurchsichtige Aggregate von langen und sehr dünnen Nadeln, die sich gut absaugen lassen. Dieses Salz ist gegen das Licht viel weniger empfindlich als die anderen Silberverbindungen des Arginins, und die wässerige Lösung desselben wird beim Verdampfen auf dem Wasserbade gar nicht reducirt, sobald die Substanz rein ist. Die Reaction der wässerigen Lösungen ist sehr schwach sauer.

Das Salz wurde über Schwefelsäure getrocknet und analysirt.

XXIV. 0,1634 gr. Substanz lieferten 29,6 ccm. feuchten N^o) (16,5°; 741,5 mm. Bar.).

XXV. 0,1852 gr. Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0492 gr. Ag.

XXVI. 0,1338 gr. Substanz (aus der Mutterlauge der ersten Portion) lieferten beim Glühen 0,0356 gr. Ag.

XXVII. 0,1709 gr. Substanz von einer anderen Darstellung gaben beim Glühen 0,0450 gr. Ag.

1) Die Darstellung s. S 181.

2) Wie beim sauren Argininnitrat wurde auch hier etwas weniger N gefunden.

	Gefunden:				Berechnet für:
	XXIV.	XXV.	XXVI.	XXVII.	$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + AgNO_3$
N	20,55 %	—	—	—	20,68 %
Ag	—	26,57 %	26,61 %	26,33 %	26,50 %

Bei der Löslichkeitsbestimmung wurde beobachtet, dass die warmgesättigten Lösungen des Salzes beim Erkalten sehr leicht, sogar beim Reiben mit einem Glasstabe übersättigt bleiben. Darum wurde die warmgesättigte wässrige Lösung in 2 Portionen getheilt: die eine wurde nach 9 Stunden und häufigem Reiben mit einem Glasstabe abfiltrirt und das Filtrat zur Löslichkeitsbestimmung verwandt (XXVIII), während die Löslichkeit in der zweiten Portion (XXIX) nach 6tägigem Stehen bei einer constanten Temperatur und unter Abschluss des Lichtes und häufigem Reiben mit dem Glasstabe bestimmt wurde. Die Resultate der beiden Versuche waren ganz übereinstimmend:

XXVIII. 23,722 gr. der bei 16° gesättigten Lösung hinterliessen 2,8683 gr. des im Vacuum über Schwefelsäure getrockneten Rückstandes.

XXIX. 29,854 gr. der bei 15,5—16° gesättigten Lösung gaben 3,6110 gr. des im Vacuum über Schwefelsäure getrockneten Rückstandes.

Also löst sich bei 15,5—16° 1 Theil des Salzes in 7,27 Theilen Wasser oder 100 Theile Wasser lösen 13,75 resp. 13,76 Theile Salz.

Die Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens in wässriger Lösung gab folgendes Resultat:

N° 23: l = 2; p = 8,112°; $d_4^{20} = 1,0452$; c (ber.) = 8,479°; $\alpha = + 0,95''$
 $[\alpha]_D^{20} = + 5,60.$

Auf Argininnitrat berechnet ist $[\alpha]_D^{20} = + 9,61$. Das specifische Drehungsvermögen von Argininnitrat wird folglich durch Silbernitrat nicht geändert.

Saures Argininsilbernitrat schmilzt unter starker Zersetzung. Die eine Portion schmolz bei 180—183°: der Zersetzungspunkt des Salzes von einer anderen Darstellung lag bei 180—181°, des Salzes von einer dritten Darstellung bei 176—177°.

Basisches Argininsilbernitrat, $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$, wurde, wie auch das entsprechende saure Salz,

zuerst von Hedin¹⁾ dargestellt. Ich habe es aus dem sauren Argininsilbernitrat durch Versetzen der Lösung desselben mit der berechneten Menge von Barytwasser und durch 4mal wiederholte Krystallisation aus heissem Wasser (vgl. S. 182) erhalten. Das basische Argininsilbernitrat krystallisirt in rosettenartigen oder warzenförmigen Aggregaten von farblosen, durchsichtigen, schief abgeschnittenen Prismen, die viel kürzer und dicker sind als die Krystalle von saurem Argininsilbernitrat. Die Lösungen von basischem Argininsilbernitrat reagiren, der Angabe von Hedin²⁾ entsprechend, stark alkalisch. Dieses Salz ist weniger beständig als das saure Argininsilbernitrat; es färbt sich viel leichter am Licht, und sogar die reinen Lösungen desselben werden beim Verdampfen auf dem Wasserbade schwach reducirt, wenigstens an den Wänden der Schale, wo das feste Salz sich beim Verdampfen ausscheidet.

XXX. 0,1617 gr. der lufttrockenen Substanz gaben beim Glühen 0,0497 gr. Ag.

XXXI. 0,2595 gr. der lufttrockenen Substanz von einer anderen Darstellung hinterliessen beim Glühen 0,0787 gr. Ag.

XXXII. 0,2226 gr. der bei 100° getrockneten Substanz³⁾ lieferten beim Glühen 0,0696 gr. Ag.

Gefunden:

Berechnet für:

XXX.	XXXI.	XXXII.	$C_6H_{14}N_4O_8 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$	$C_6H_{14}N_4O_8AgNO_3$
Ag 30,74%	30,33%	31,27%	30,55%	31,35%

Bei der Löslichkeitsbestimmung wurde gefunden, dass

XXXIII. 40,018 gr. der bei 16—16,5° gesättigten wässerigen Lösung 0,4459 gr. des im Vacuum getrockneten Rückstandes hinterliessen.

1 Theil Salz löst sich somit bei 16—16,5° in 88,7 Theilen Wasser oder 100 Theile Wasser lösen 1,13 Theile Salz; nach Hedin (l. c.) löst sich 1 Theil Salz bei 16° in 81 Theilen Wasser. Die Lösungen von basischem Argininsilbernitrat bleiben leicht übersättigt; in Folge dessen krystallisirt das Salz gewöhnlich nach mehreren Stunden nach dem Erkalten seiner Lösung und kann somit von der sogleich nach dem Erkalten sich ausscheidenden amorphen Substanz getrennt werden

1) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XX, S. 187.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 156.

3) Das Salz wurde dabei hellbraun.

(S. 182). In heissem Wasser ist die Substanz viel leichter löslich als in kaltem: in Alkohol und Aether ist sie unlöslich.

Basisches Argininsilbernitrat hat einen scharfen Zersetzungspunkt, der beim langsamen Erhitzen bei 164° liegt.

Argininsilber. Versetzt man eine wässrige Lösung von saurem oder basischem Argininsilbernitrat mit so viel Silbernitrat, dass auf 1 Molekül Arginin 2 Moleküle Silbernitrat vorhanden sind, und setzt dann zu der Mischung die Menge von Barytwasser oder Natronlauge, welche nothwendig ist, um die Salpetersäure vollständig zu binden, so bekommt man einen voluminösen, schneeweissen, amorphen Niederschlag, der zuerst beim Umrühren verschwindet, später aber, wenn alles saure Argininsilbernitrat in das basische Salz übergeführt ist, constant wird. Ich habe einige Versuche der Darstellung dieser Verbindung gemacht, die unter folgenden Bedingungen ausgeführt wurden:

1. Saures Argininsilbernitrat wurde mit den berechneten Mengen von Silbernitrat und $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge versetzt:

2. es wurden nur 80% der nöthigen Menge von Silbernitrat und etwa 70% der berechneten Menge von 3%igem Barytwasser verbraucht:

3. zu einer Lösung von basischem Argininsilbernitrat wurde so viel Silbernitrat hinzugefügt, dass die Lösung bei der Tüpfelprobe mit Natronlauge eine gelbe Färbung gab: dann wurde die Flüssigkeit mit so viel $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge versetzt, dass auf 1 Molekül Arginin 2 Moleküle Natronlauge vorhanden waren:

4. eine Lösung von saurem Argininsilbernitrat mit der zugesetzten äquimolekularen Menge von Silbernitrat wurde mit etwa 60% der nothwendigen Quantität von 3%igem Barytwasser gemischt, der entstandene Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat mit weiteren etwa 35% der berechneten Menge von Barytwasser versetzt. Dieser zweite Niederschlag wurde für die Analyse genommen:¹⁾

¹⁾ Der erste Niederschlag wurde nicht analysirt, da er eine deutliche graue Farbe hatte und ohne Zweifel beigemischtes Silberoxyd enthielt, welches wahrscheinlich in Folge des zu schnellen Zufließens des Barytwassers entstanden war. Der zweite Niederschlag war schneeweiss.

5. saures Argininsilbernitrat, 99,14% der berechneten Menge von Silbernitrat und die nothwendige Quantität von $\frac{1}{10}$ Normalbarytwasser.

Alle Niederschläge wurden abfiltrirt und unter Abschluss des Lichtes sorgfältig mit Wasser bis zum vollständigen Verschwinden von jeder Spur der Reaction auf Baryt ausgewaschen, was eine lange Zeit in Anspruch nahm. Dann wurden die Niederschläge im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und analysirt.

XXXIV. 0.1726 gr. der mit gepulvertem Kupferoxyd gemischten Substanz gaben 0,1107 gr. CO_2 und 0,0510 gr. H_2O .

XXXV. 0.1486 gr. Substanz 1 lieferten 16,9 cm. feuchten N ($16,5^\circ$; 752 mm. Bar.)

XXXVI. Aus 0,1095 gr. der in verdünnter Salpetersäure gelösten Substanz 1 resultirten 0,0810 gr. AgCl.

XXXVII. 0.2065 gr. Substanz 2 gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,1298 gr. CO_2 und 0,0555 gr. H_2O .¹⁾

XXXVIII. 0.4675 gr. Substanz 2 lieferten 53,6 ccm. feuchten N (16° ; 746,5 mm. Bar.)

XXXIX. 0.1603 gr. Substanz 2 hinterliessen beim Glühen 0,0895 gr. Ag.

XL. 0.2520 gr. Substanz 2 gaben beim Glühen 0,1405 gr. Ag.

XLI. 0.1520 gr. Substanz 3 lieferten 17,1 ccm. feuchten N (17° ; 754 mm. Bar.)

XLII. 0.1366 gr. Substanz 3 gaben 0,1009 gr. AgCl.

XLIII. Aus 0.2020 gr. Substanz 4 resultirten 23,05 ccm. feuchten N ($11,5^\circ$; 741 mm. Bar.)

	XXIV.	XXV.	XXVI.	XXVII.	XXVIII.	XXIX.	XL.	XLI.	XLII.	XLIII.
C	17,50%	—	—	17,15%	—	—	—	—	—	—
H	3,31%	—	—	3,01%	—	—	—	—	—	—
N	—	13,09%	—	—	13,10%	—	—	12,95%	—	13,23%
Ag	—	—	55,68%	—	—	55,83%	55,75%	—	55,60%	—

Berechnet für:

Gefunden: $3\text{C}_6\text{H}_{11}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$

C	17,33%	16,64%
H	3,16%	3,20%
N	13,09%	12,97%
Ag	55,72%	56,10%
O	10,70%	11,09%

1) Die Substanz muss äusserst vorsichtig verbrannt werden, sonst zersetzt sie sich plötzlich, fast unter Verpuffen.

Die Resultate der Analysen XXXIV—XLIII lassen sich durch keine einfachere Formel ausdrücken, und stimmen gut mit der Formel: $3\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ¹⁾ überein. Der etwas höhere Kohlenstoffgehalt²⁾ wird wohl durch das Beimischen von Kohlensäure zu der Verbindung bedingt, wie es weiter unten erörtert wird.

Zwar haben bei der Analyse die unter den verschiedenen Bedingungen dargestellten Substanzen die untereinander gut stimmenden Zahlen gegeben, aber es scheint doch, als ob es sich hier nicht um eine einzige chemische Verbindung, sondern um eine blosse Mischung handelt, welche vorzugsweise in den oben angedeuteten Verhältnissen gebildet wird, welche aber unter den anscheinend gleichen Bedingungen auch eine andere Zusammensetzung haben kann. Wenigstens hat die Substanz 5 bei der Analyse die von früher erhaltenen Werthen abweichenden Zahlen geliefert:

XLIV. 0,1682 gr. der mit gepulvertem Kupferoxyd gemischten Substanz 5 gaben 0,1078 gr. CO_2 und 0,0473 gr. H_2O .

XLV. 0,2556 gr. der mit gepulvertem Kupferoxyd gemischten Substanz lieferten 0,1669 gr. CO_2 und 0,0718 gr. H_2O .

XLVI. Aus 0,2552 gr. Substanz resultirten 29,1 ccm. feuchter N (12°; 746 mm. Bar.)

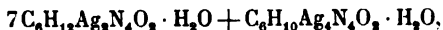
XLVII. 0,1221 gr. Substanz gaben 0,0874 gr. AgCl .

XLVIII. 0,0983 gr. Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0532 gr. Ag . Gefunden:

	XLIV.	XLV.	XLVI.	XLVII.	XLVIII.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
C	17,48%	17,81%	—	—	—	17,73%	14,03%
H	3,15%	3,14%	—	—	—	3,48%	2,55%
N	—	—	13,28%	—	—	13,83%	10,94%
Ag	—	—	—	53,88%	54,12%	53,15%	63,10%
O	—	—	—	—	—	11,81%	9,38%

Also wurde in diesem Falle ein Gemenge erhalten, in dem viel weniger von der Base mit dem höheren Gehalt an Silber vorhanden war. Der Kohlenstoffgehalt war auch in der

1) Oder auch mit der Formel:



worüber die Analyse selbstverständlich keine Entscheidung treffen kann.

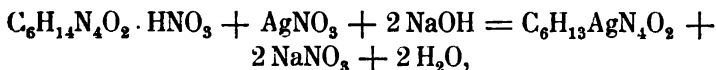
2) Das Verhältniss von C:N = 1,55:1, während es eigentlich niedriger als 1,50:1 sein sollte.

Substanz 5 etwas grösser, als berechnet ist, nämlich war $C:N = 1,55:1$.

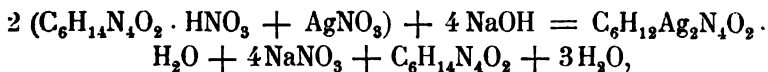
Ich habe versucht, die 3 Moleküle Silber enthaltende Base darzustellen. Zu dem Zwecke habe ich die Lösung von basischem Argininsilbernitrat mit so viel Silbernitrat versetzt, dass auf 1 Molekül Arginin 3 Moleküle Silbernitrat enthalten waren, und dann zu der Lösung vorsichtig $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge zugesetzt. Dabei waren aber schon die ersten Portionen des entstandenen Niederschlages bräunlich-grau gefärbt, enthielten somit beigemischtes Silberoxyd. Der höchste Silbergehalt, welchen ich im Argininsilber bis jetzt finden konnte, war 57,06% (Anal. II); so viel Silber enthielt nämlich die Verbindung, welche sich als eine geringe, schneeweisse Fällung ausschied, als das Filtrat von dem Niederschlage 3 (s. oben) mit $\frac{1}{8}$ der schon verbrauchten Menge von $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge versetzt wurde:

IL. 0,0843 gr. Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0481 gr. = 57,06% Ag.

Als die Lösung von saurem Argininsilbernitrat, wozu kein Silbernitrat hinzugefügt wurde, mit der für die Neutralisation von aller Salpetersäure nöthigen Menge von $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge versetzt wurde, entstand keine Monosilberbase nach der Gleichung:



sondern war die zwei Atome Silber enthaltende Base nach der Gleichung:



als ein schneeweisser, käsiger Niederschlag gebildet; die Reaction der Mischung war der zweiten Gleichung gemäss keine neutrale, sondern basisch.

L. 0,2162 gr. Substanz gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,1432 gr. CO_2 und 0,0694 gr. H_2O .

LI. 0,0964 gr. Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0520 gr. Ag.

LII. Aus 0,1014 gr. Substanz wurden 0,0725 gr. AgCl erhalten.

LIII. 0,2268 gr. Substanz von einer anderen Darstellung lieferten beim Glühen 0,1216 gr. Ag.

	Gefunden:				Berechnet für:
	L.	LI.	LII.	LIII.	$C_6H_{12}Ag_2N_4O_2 \cdot H_2O$
C	18,07 %	—	—	—	17,73 %
H	3,59 %	—	—	—	3,48 %
Ag	—	53,94 %	53,82 %	53,62 %	53,15 %

Somit hatten die analysirten Verbindungen die Zusammensetzung der Silberbase: $C_6H_{12}Ag_2N_4O_2 \cdot H_2O$, der noch eine geringe Menge der Silberbase mit 3 Atomen Silber beige-mischt war.

Die Verbindung $C_6H_{12}Ag_2N_4O_2 \cdot H_2O$ ist dem von Hedin¹⁾ erhaltenen Histidinsilber, $C_6H_7Ag_2N_3O_2 \cdot H_2O$, ganz analog, wird aber nicht, wie dieses, durch Zufügen von Ammoniak zur Lösung von Argininsilbernitrat gefällt, sondern bedarf für ihre Bildung der Mitwirkung von Baryt- oder Natronhydrat. Für das Argininsilber gibt es noch zwei die Sache complicirende Verhältnisse, welche dem Histidinsilber, wie es scheint, fehlen, und welche durch viel stärkere basische Eigenschaften des Arginins dem Histidin gegenüber erklärt werden können; diese Verhältnisse sind:

1. Ausser $C_6H_{12}Ag_2N_4O_2 \cdot H_2O$ wird noch eine Base von der vermuthlichen Zusammensetzung $C_6H_{11}Ag_3N_4O_2 \cdot H_2O$ gebildet. Diese letztere entsteht im Verhältniss zu der ersten Base in einer viel geringeren Menge. Dass die bei der Analyse XXXIV—XLVIII gefundenen Werthe durch die Beimischung von Silberoxyd beeinflusst wurden, ist nicht anzunehmen, da die Gegenwart von geringsten Mengen des Silberoxyds durch die Veränderung der Farbe des Niederschlages leicht zu entdecken wäre, während sogar die 57,06 % Ag enthaltende Verbindung (Anal. II) eine schneeweiße Farbe hatte. Soweit meine Beobachtungen reichen, bildet sich Silberoxyd nur dann, wenn man die Lösung der gleichen Moleküle von basischem Argininsilbernitrat und von Silbernitrat mit den ersten Portionen der nöthigen Menge von 3%igem Barytwasser versetzt, ohne tüchtig umzurühren; dabei kann ein gelblich-grauer Niederschlag entstehen, welcher sich, wenn keine grössere Menge von Barythydrat auf einmal zugesetzt war, beim Umrühren in einen

1) S. G. Hedin, diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 194.

rein weissen umwandelt: nach weiterem Zusatz von Barytwasser scheidet sich ein weisser Niederschlag ab. Nimmt man $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge oder $\frac{1}{10}$ Normalbarytwasser, so bekommt man nur die weisse Fällung. Desgleichen zeigen die Analysen LI—LIII, dass das Plus im Silbergehalt nicht durch beigemischtes Silberoxyd bedingt ist.

2. Das Argininsilber zieht aus der Luft etwas Kohlensäure an, wovon das constante Plus im Kohlenstoffgehalt abhängt. Es ist nicht zu verkennen, dass Kohlenstoffbestimmungen im Argininsilber mit einigen Schwierigkeiten verknüpft sind, da die Substanz äusserst vorsichtig erhitzt werden muss, sonst verbrennt sie zu rasch, fast unter Verpuffung, wodurch leicht ein Fehler in Folge der Bildung von den durch die Kupferspirale nicht reducirten Stickstoffoxyden entstehen kann. Dadurch wurde theilweise der Kohlenstoffwerth bei der Analyse L erhöht, welche die erste von mir ausgeführte Verbrennung des Argininsilbers war, und wo das Wasser im Chlorcalciumrohr in der That deutlich sauer reagirte. Da aber auch diejenigen Verbrennungen, welche ganz vorsichtig und regelmässig vor sich gingen, und sogar diejenigen Analysen, bei welchen die Substanz mit einer grossen Menge von gepulvertem Kupferoxyd gemischt verbrannt wurde, und bei welchen das Wasser des Chlorcalciumrohres ganz neutral reagirte, immer doch ein Plus im Kohlenstoffgehalt gegeben haben, so muss noch eine andere Quelle für diesen constanten Fehler vorhanden sein, und zwar die Beimischung von einem Carbonate zu der Silberbase. Dies liess sich beweisen, als etwa 0,2 gr. der Substanz 4 mit Wasser, dem einige Tropfen Schwefelsäure zugesetzt waren, gekocht und die Dämpfe durch Barytwasser durchgeleitet wurden. Es entstand sofort eine deutliche Trübung, welche bei der Kontrollprobe ausblieb. Also verhält sich das Argininsilber der Kohlensäure gegenüber wie das Arginin selbst.

Das Argininsilber stellt nach dem Trocknen eine weisse Masse dar, die sich leicht zu einem sehr feinen Pulver zerreiben lässt, wobei sie stark elektrisch wird. Am zerstreuten Tageslicht wird das trockne Argininsilber ziemlich rasch dunkel, während es in Form des unter Wasser vertheilten Nieder-

schlages gegen das Licht viel weniger empfindlich ist. Durch Wärme wird die Verbindung in feuchtem Zustande leicht zersetzt; das mit Wasser benetzte Argininsilber wurde bei 50° stark dunkel, bei 75° schwarz, während das trockene Argininsilber sich sogar bei 100° nur sehr schwach bräunt. Die Verbindung zersetzt sich bei stärkerem Erhitzen, bisweilen fast unter Verpuffen, ohne zu schmelzen.

Das Argininsilber löst sich äusserst schwer in kaltem Wasser, schwer in heissem, wobei die Substanz sich beträchtlich schwärzt;¹⁾ nach dem Erkalten der filtrirten Lösung scheidet sich ein amorpher, weisser Niederschlag ab. In Säuren, sogar in der Essigsäure, löst sich die Verbindung leicht. Ebenfalls löst sich der frisch gefällte Niederschlag derselben sehr leicht in Ammoniak und scheidet sich nach dem Entweichen des Ammoniaks amorph aus. Das Argininsilber löst sich auch in der Lösung von Arginin, allerdings nicht besonders leicht; durch die Mitwirkung des freiwerdenden Arginins wird wahrscheinlich auch die Erscheinung bedingt, dass die mit Natronlauge versetzte Lösung von einem Argininsilbernitrat einen Niederschlag gibt, der sich in der überschüssigen Natronlauge leicht und vollständig auflöst, während der bei Gegenwart einer genügenden Menge des hinzugefügten Silbernitrates entstandene Niederschlag des Argininsilbers (mit einem grösseren Gehalt an Silber) sich in einem Ueberschuss von Natronlauge so gut wie gar nicht löst.

Um die Löslichkeit des Argininsilbers in destillirtem Wasser und in Barytwasser zu ermitteln, was bei der Fällung des Arginins nach dem Kossel'schen Verfahren von Wichtig-

1) Stellt man das basische Argininsilbernitrat auf solche Weise dar, dass man die Lösung des sauren Salzes bis zur constanten Trübung mit einem Alkali versetzt, den Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat bis zur Krystallisation eindampft, so schwärzt sich die Flüssigkeit mehr oder weniger stark, und nach Erkalten der nochmals filtrirten Lösung scheidet sich eine geringe, amorphe, eventuell klebrige Fällung aus, die aus dem Argininsilber besteht. Durch die Gegenwart der bei der Reaction gebildeten Silberbase wird zum Theil die Reduction der Lösungen von basischem Argininsilbernitrat hervorgerufen.

keit sein kann, habe ich folgende Versuche gemacht. Der frisch gefällte und ausgewaschene Niederschlag von Argininsilber 5 wurde mit 200 ccm. destillirtem Wassers resp. 200 ccm. kalt gesättigter Lösung von Barythydrat in 3%iger Lösung von Baryumnitrat in Flaschen mit Glasstopfen unter Abschluss des Lichtes mit Hülfe einer Maschine 4 Stunden lang geschüttelt, von dem Filtrate ein abgemessenes Volumen genommen und mit Schwefelwasserstoff (bei der barythaltigen Lösung nach vorherigem Ansäuern mit Essigsäure) zersetzt, die Flüssigkeit stark eingedampft, der Niederschlag von Schwefelsilber abfiltrirt, ausgewaschen und sammt dem Filtrum im Rose'schen Tiegel im Wasserstoffstrome, dann an der Luft geglüht, und metallisches Silber gewogen.

LIV. 197 ccm. der Lösung im destillirten Wasser gaben 0,0088 gr. Ag.

l.V. 168 ccm. der Lösung in Barytwasser + Baryumnitrat lieferten 0,0078 gr. Ag.

Daraus folgt, dass in 1 Liter destillirten Wassers sich bei gewöhnlicher Temperatur 0,035 gr. resp. in 1 Liter Lösung von Barythydrat + Baryumnitrat 0,036 gr. Arginin in Form von Argininsilber lösen, so dass die Löslichkeit des Argininsilbers in beiden Lösungsmitteln als eine gleiche zu betrachten ist. Der Niederschlag der ungelöst gebliebenen Verbindung war in dem ersten Versuche ganz weiss, in dem zweiten mit einer kaum bemerkbaren braunen Nuance. Beim Schütteln mit 3%iger Natronlauge wird der Niederschlag deutlich braun, und es löst sich dreimal so viel Substanz als im Wasser.

Dibenzoylarginin, $C_6H_{12}(C_6H_5 \cdot CO)_2N_4O_2$, habe ich durch die Benzoylirung nach der Schotten-Baumann'schen Methode dargestellt. Unmittelbar aus der alkalischen Flüssigkeit scheidet sich nur ein äusserst geringer, klebriger, bräunlicher Niederschlag ab, während das Dibenzoylarginin sich aus dem Filtrate davon erst nach dem Ansäuern ausscheidet. Ich bin dabei in folgender Weise verfahren: die filtrirte Flüssigkeit wird in einen Scheidetrichter gebracht, mit etwa $\frac{1}{2}$ Volumen Aether überschichtet und mit verdünnter Salzsäure versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht resp. bis die wässrige Flüssigkeit eine deutliche Reaction auf Congo angenommen hat.

Die ausgeschiedene Benzoesäure löst sich beim Schütteln im Aether, während das Dibenzoylarginin sich als ein zum Theil käsiger, zum Theil pulveriger Niederschlag¹⁾ gewöhnlich an der Grenze zwischen der wässerigen und der ätherischen Schicht absetzt. Man trennt den Niederschlag von beiden Flüssigkeiten möglichst ab, spült ihn 2—3 mal mit wenig kaltem Wasser aus, saugt ab und wäscht behufs der Entfernung von Benzoesäure einige Male mit Aether unter schwachem Absaugen aus.²⁾ Nach dem Trocknen krystallisirt man den Niederschlag 1—2 mal aus kochendem Wasser um. Nach dem Erkalten der durch den Heisswassertrichter filtrirten Lösung scheidet sich ein Filz von kleinen, noch mit blossen Auge gut erkennbaren Nadelchen aus, welche abfiltrirt, ausgewaschen und analysirt wurden.

LVI. 0,1040 gr. der bei 125° getrockneten Substanz 1 gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,0557 gr. H_2O .³⁾

LVII. 0,1136 gr. der Substanz 1 lieferten beim Verbrennen im Schiffchen 0,0604 gr. H_2O .

LVIII. 0,1370 gr. der bei 120° getrockneten Substanz 2 gaben beim Verbrennen mit Bleichromat gemischt 0,3139 gr. CO_2 und 0,0779 gr. H_2O .

LIX. Aus 0,1100 gr. der Substanz 1 resultirten 14,05 ccm. feuchter N (13°; 750 mm. Bar.)

. LX. 0,2544 gr. der Substanz 2 lieferten 32,3 ccm. feuchten N (13,5°; 746 mm. Bar.)

	Gefunden:					Berechnet für:
	LVI.	LVII.	LVIII.	LIX.	LX.	$C_{20}H_{22}N_4O_4$
C	—	—	62,50%	—	—	62,78%
H	5,96%	5,95%	6,36%	—	—	5,80%
N	—	—	—	14,89%	14,69%	14,69%
O	—	—	—	—	—	16,73%

1) Bisweilen, namentlich aus etwas warmen Flüssigkeiten, scheidet sich auch ein klebriger Niederschlag ab, der sich beim Stehen in den käsigen oder pulverigen verwandelt.

2) Sollte das Absaugen langsam vor sich gehen, so könnte man den Niederschlag vorsichtig abpressen, trocknen und dann mit Aether extrahiren; bei meinen Versuchen war es nicht nothwendig. Im Aether löst sich bei dem oben beschriebenen Verfahren nur eine ganz geringe Menge von einer stickstoffhaltigen Substanz.

3) Die Kohlenstoffbestimmungen in den Analysen LVI u. LVII lieferten nur etwa 60% C in Folge der unvollständigen Verbrennung von Kohlenstoff, da die Substanz eine schwer verbrennliche Kohle hinterlässt.

Die Verbindung scheidet sich ohne Krystallwasser aus.

Die Ausbeute an Dibenzoylarginin ist beim einmaligen Benzoyliren gering. In einem Versuche, wo ich 1,8 gr. Arginin-nitrat in 25 ccm. Wasser gelöst mit 120 ccm. 10%iger Natronlauge und 15 ccm. Benzoylchlorid geschüttelt habe, war die Ausbeute an roher Substanz 25—30% der theoretischen: ein anderer Versuch, wo 2,5 gr. Arginnitrat in 25 ccm. Wasser gelöst und abwechselnd mit 50 ccm. 15%iger Natronlauge und 9 gr. reinem Benzoylchlorid¹⁾ nach und nach unter kräftigem Schütteln gemischt wurde, lieferte nur 15% der theoretischen Ausbeute. Eine viel grössere Ausbeute lässt sich aber erzielen, wenn man die vom Niederschlage des Dibenzoylarginins getrennte wässrige Flüssigkeit verdampft und nochmals benzoylirt, und diese Operation auch mit der neuen erhaltenen wässrigen Flüssigkeit wiederholt. Auf diese Weise wurde die gesammte Ausbeute bis zu 50% der theoretischen erhöht.

Ich konnte das Dibenzoylarginin auch krystallographisch untersuchen, da Herr Geheimrath Prof. M. Bauer die grosse Freundlichkeit hatte, mir die zu einer krystallographischen Untersuchung nothwendige Apparate gütigst zur Verfügung zu stellen. Für die Erlaubniss, in seinem Institute einige krystallographische Arbeiten auszuführen, bin ich Herrn Prof. M. Bauer zu verbindlichstem Dank verpflichtet.

Das Dibenzoylarginin krystallisirt unter dem Mikroskop aus heissen Lösungen in langen Nadeln und in rhombischen, sehr regelmässig ausgebildeten Tafeln; hauptsächlich in der ersten Form krystallisirt die Substanz bei raschem Erkalten ihrer heissen, wässrigen Lösungen, während man die Ausscheidung von Tafeln vorzugsweise beim langsamen Erkalten beobachtet. Die Nadeln sind gewöhnlich etwas gebogen und verästelt resp. sternförmig gruppirt; ihre Enden sind meistens zersplittert, doch waren auch Nadeln vorhanden, deren Endfläche gegen die lange Kante geradwinkelig stand. Die Auslöschung der Polarisationssebene ist der langen Kante parallel, welche die Axe der grösseren Elasticität ist. Auf der breiten

1) Siedepunkt constant bei 197—197,5° (735 mm. Bar.)

Fläche der Nadeln ist der Austritt der ersten Mittellinie gut sichtbar, und die Ebene der optischen Axen ist der langen Kante parallel: die Krystalle sind somit positiv. Die Farbenscenen sind deutlich sichtbar und werden durch die beiden dunklen Balken symmetrisch halbirt: die Krystalle gehören folglich dem rhombischen System an. Der Linearwinkel von tafelförmigen Krystallen ist $63,5-64,5^\circ$; die Auslöschung der Polarisationssebene ist in den Tafeln diagonal und die kürzere Diagonale fällt mit der Axe der grösseren Elasticität und mit der Ebene der optischen Axen zusammen; die Tafeln zeigen den Austritt der ersten Mittellinie. Somit sind die beiden Krystallarten untereinander identisch und nur nach zwei senkrechten Richtungen ausgebildet.

In kochendem Wasser ist das Dibenzoylarginin schwer löslich: beim anhaltenden Kochen löst sich ein Theil der Substanz in etwa 750 Theilen Wasser. In kaltem Wasser ist das Dibenzoylarginin noch weniger, in kochendem Alkohol leichter löslich.

Das Dibenzoylarginin schmilzt unter schwacher Zersetzung bei $217,5-218^\circ$; die Substanz von einer anderen Darstellung schmolz bei $217-217,5^\circ$.

Die wässerigen Lösungen von Dibenzoylarginin zeigen keine saure Reaction, doch ist nicht zu vergessen, dass diese Substanz in Wasser schwer löslich ist. In verdünnter Natronlauge wird sie leicht gelöst und daraus durch Salzsäure ausgefällt. 0,1 gr. Dibenzoylarginin, mit reinem Calciumcarbonat längere Zeit gekocht, liess im Filtrate nur eine sehr geringe Menge von Calcium entdecken.

Das Dibenzoylarginin zeigt in seinen Eigenschaften so viel Aehnlichkeit mit der Ornithursäure, dass es kaum zu bezweifeln ist, dass im Arginin bei der Benzoylirung nach der Schotten-Baumann'schen Methode dieselben zwei Amidogruppen in die Reaction hereingezogen werden, in denen auch bei der Benzoylirung des Ornithins die Wasserstoffatome vertreten werden.

Als das wichtigste Resultat meiner Arbeit möchte ich hervorheben, dass das von mir untersuchte ζ -Arginin mit dem von Schulze und Steiger¹⁾ aus den Pflanzen gewonnenen φ -Arginin sicher nicht identisch, sondern nur isomer ist. Die ausserordentlich grosse Aehnlichkeit, welche die beiden Arginine in ihren Verbindungen zeigen, schliesst die Vermuthung einer Structurisomerie aus, führt vielmehr zu der Annahme einer Stereoisomerie. Die bis jetzt gefundenen Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem aus Heringstestikeln gewonnenen Arginin sind: 1. der verschiedene Krystallwassergehalt der Chloride, von denen das des φ -Arginins krystallwasserfrei ist, während das Chlorid des ζ -Arginins 1 Molekül Krystallwasser enthält. Zwar habe ich das Argininchlorid nicht aus Wasser, sondern aus verdünntem Alkohol krystallisirt, doch kann der Unterschied nicht davon abhängig sein, da Hedin²⁾ in dem durch Spaltung des Horns durch Schwefelsäure gewonnenen und aus Wasser krystallisirten Argininchlorid ebenfalls 1 Molekül Krystallwasser gefunden hat.³⁾

2. Das φ -Arginin dreht die Polarisationssebene dreimal stärker als das ζ -Arginin (s. oben). Da der einzige Unterschied zwischen den chemischen Operationen, denen das eine und das andere Arginin unterworfen wurde, darin bestand, dass ζ -Arginin mit verdünnter Schwefelsäure gekocht und in die Silberbase bei gewöhnlicher Temperatur übergeführt wurde, so ist die Annahme einer theilweisen Racemisirung desselben kaum statt- haft, desto weniger, da die von mir polarimetrisch unter- suchten Salze des Arginins: das Chlorid, Nitrat und Sulfat, auf ganz verschiedenen Wegen gereinigt wurden.⁴⁾ Wären

1) E. Schulze und E. Steiger, Diese Zeitschr., Bd. XI. S. 52.

2) S. G. Hedin, ibid, Bd. XXI. S. 156.

3) Es existirt vielleicht noch ein Unterschied den Krystallwasser- gehalt von Argininkupfernitrat betreffend: meine Präparate enthielten $3\frac{1}{2}$ Moleküle Wasser, während Schulze und Steiger (l. c.) und Hedin (diese Zeitschr., Bd. XX, S. 192) nur 3 Moleküle Wasser gefunden haben. Doch will ich diesen Unterschied nicht betonen, da er von der Art der Vorbereitung des Salzes zur Wasserbestimmung abhängig sein kann.

4) In allen Fällen war zuerst das freie Arginin durch Vermittelung seiner Silberbase dargestellt. Das Chlorid wurde dann direkt aus dem

somit diese Salze ein Gemenge von dem rechtsdrehenden Arginin mit dem Racemat, so müssten sie grosse Unterschiede bei der Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens zeigen, während die von mir gefundenen Unterschiede vollständig erklärt werden durch die Veränderung, die das specifische Drehungsvermögen des Arginins erleidet in Folge des Eintritts von verschiedenen Säuren, die das Drehungsvermögen der Amidverbindungen bekanntlich verschieden stark und in derselben Reihenfolge beeinflussen, wie ich es für das Arginin beobachtet habe.

Ebensowenig ist die Voraussetzung annehmbar, dass das Clupein schon von vornherein ein Gemenge von viel rechtsdrehendem und wenig linksdrehendem Arginin enthielt. Solches Gemenge von Antipoden, die ja gleich löslich sein müssen, würde auch durch die Krystallisation zu trennen, oder wenigstens in seiner Zusammensetzung quantitativ zu verändern sein.

Die Frage, ob das α -Arginin im Molekül der Protamine resp. der thierischen Eiweissstoffe präformirt vorhanden ist, oder ob es erst durch die gewissen chemischen Operationen entsteht, soll durch weitere Untersuchungen von verschiedenen Präparaten des Arginins endgültig entschieden werden, vor Allem durch die Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens des Arginins, welches durch die tryptische Verdauung der Eiweissstoffe, d. h. ohne Mitwirkung von Säuren und von höherer Temperatur entsteht. Doch zweifle ich jetzt schon kaum daran, dass im Molekül der thierischen Substanzen ein Rest von einem Arginin enthalten ist, das mit dem pflanzlichen Arginin nur isomer und nicht identisch ist.

Arginin dargestellt und einmal aus Wasser und einige Male aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt. Für die Darstellung des Nitrates wurde das Arginin in saures Argininsilbernitrat übergeführt, dieses umkrystallisirt und daraus das basische Salz dargestellt, welches zweimal krystallisirt und dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Das Sulfat wurde auf folgende Weise erhalten: aus dem Arginin das Arginkupfernitrat dargestellt, zweimal krystallisirt, wiederum in die Silberbase und in freies Arginin übergeführt, daraus Arginkupfersulfat erhalten, welches zweimal krystallisirt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde.

Existiren in der That zwei rechtsdrehende Arginine, so folgt daraus mit Nothwendigkeit, dass im Molekül des Arginins wenigstens zwei asymmetrische Kohlenstoffatome enthalten sind.

Die weiteren polarimetrischen Untersuchungen sind auch von dem Standpunkt aus sehr wünschenswerth, dass dadurch die Möglichkeit für eine genauere quantitative Bestimmung des Arginins gegeben wird. Da das specifische Drehungsvermögen des Argininchlorids bei einem genügenden Gehalt an Salzsäure constant ist, so kann man nach der Zersetzung des Niederschlages von Argininsilber bei Gegenwart eines Ueberschusses der Salzsäure nach Entfärbung der Lösung mit Thierkohle durch Polarisirung eines festgesetzten Quantums der Flüssigkeit die Menge des Arginins bestimmen, sobald das specifische Drehungsvermögen dieses Arginins bekannt ist.

Marburg a. d. L., den 25. Februar 1899.

=====

Weitere Beiträge zur Erforschung der Bedingungen der Harnsäurebildung.

Von

Dr. med. J. Weiss.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Prof. G. v. Bunge in Basel.)

(Der Redaction zugegangen am 26. März 1899.)

Nachdem ich in meiner vorhergehenden Arbeit¹⁾ die Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Verminderung der Harnsäureausscheidung behandelte, beschäftigte mich die Frage, durch welche Stoffe eine Vermehrung derselben sich erzielen lässt. Ich wählte zuerst einen Körper, welcher einen Reiz auf die Darmschleimhaut und dadurch eine vermehrte Leukocythenansammlung bewirkt, das Crotonöl. Wie nachstehende Tabelle zeigt, ergab sich ein negatives Resultat.

Versuch I.

Tägliche Nahrung: 400 gr. Fleisch, 200 gr. Brot, 50 gr. Butter, 90 gr. Zucker, 3 gr. Kochsalz, 2 Eier, 2 l. Wasser, 30 gr. Johannisbeersyrup.

Versuchstag	Harnvolumen	Stuhlgang	Harnsäure (Salk.)	
2.	1740	normal	0,6194	{ 1 Tropfen Ol. crotonis.
3.	1245	6 dünne Stühle	0,6553	
4.	1150	normal	0,6759	
5.	1470	>	0,6474	

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. XXV, 1898, S. 393 ff.

Ein gleich negatives Resultat ergaben die Versuche mit Glycocoll und Harnsäure selbst.

Versuch II.

Tägliche Nahrung: 400 gr. Fleisch, 200 gr. Brot, 50 gr. Butter, 90 gr. Zucker, 3 gr. Kochsalz, 2 Eier, 1½ l. Wasser, 30 gr. Johannisbeersyrup.

Versuchstag	Harnvolumen	Stuhlgang	Harnsäure (Salk.)	
2.	902	normal	0,6880	
3.	1450	>	0,7968	{ 10 gr. Glycocoll.
4.	1220	>	0,6633	
5.	1430	>	0,7552	

Versuch III.

Versuchstag	Harnvolumen	Stuhlgang	Harnsäure (Salk.)	
2.	1250	normal	0,6673	
3.	1330	>	0,7219	{ 10 gr. Acid. uric.
4.	1280	>	0,7054	
5.	1050	>	0,6938	

Die tägliche Nahrung bei Versuch III war dieselbe wie bei Versuch II. Mit Harnsäure hat auch bereits Stadthagen,¹⁾ allerdings an einem Leukämiker, Versuche mit negativem Resultate angestellt. Uebereinstimmend mit den Versuchen von Hess und Schmoll²⁾ fand ich dagegen eine starke Vermehrung der Harnsäureausscheidung bei Gaben von Thymus und Pancreas.

Versuch IV.

Tägliche Nahrung: 400 gr. Fleisch, 200 gr. Brot, 50 gr. Butter, 90 gr. Zucker, 3 gr. Kochsalz, 1½ l. Wasser.

Versuchstag	Harnvolumen	Harnsäure (Salk.)	
2.	1540	0,4862	
3.	1630	0,8027	{ je 375 gr. Kalbsthymus als Ersatz für 375 gr. Fleisch vom Lenden.
4.	1420	1,1893	
5.	1520	1,1270	
6.	1530	0,5063	

1, Virchow's Archiv 109. S. 411.

2, Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd 37.

Versuch V.

Tägliche Nahrung: Dieselbe wie bei Versuch IV.

Versuchstag	Harnvolumen	Harnsäure (Salk.)	
2.	1520	0,4850	{ 200 gr. Schweinepancreas als Ersatz für 200 gr. Fleisch vom Lenden.
3.	1310	0,7106	
4.	1430	0,5032	
5.	1510	0,4927	

Die Vermehrung der Harnsäureausscheidung unterblieb jedoch, wenn ich den Gaben von Thymus Chinasäure hinzufügte.

Versuch VI.

Tägliche Nahrung: Dieselbe wie bei Versuch IV und V.

Versuchstag	Harnvolumen	Harnsäure (Salk.)	
2.	1430	0,7477	{ je 250 gr. Kalbs- thymus als Ersatz für 250 gr. Lenden- beefsteak. } je 50 gr. Chinasäure.
3.	1472	0,8017	
4.	1485	1,1964	
5.	1450	1,5869	

Ich muss noch bemerken, dass ich die Versuche I, II, III und VI an mir selbst, die Versuche IV und V an einer anderen Person machte, welche aber unter meiner steten Kontrolle stand; daher rührt der Unterschied in der Angabe der normalen Harnsäureausscheidung.

— — — — —

Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungs- produkte mittelst Zinksulfat.

Von

Dr. E. Zunz (Brüssel).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 19.)

(Der Redaction zugegangen am 28. März 1899.)

E. P. Pick¹⁾ hat durch fractionirte Fällung mit Ammonsulfatlösung, nach dem von Hofmeister und seinen Schülern Kauder,²⁾ Pohl,³⁾ Lewith⁴⁾ und Reye⁵⁾ schon in früheren Untersuchungen mit Erfolg angewendeten Verfahren, die Trennung der verschiedenen Albumosen, die in dem käuflichen Witte-Pepton enthalten sind, erreicht. Auf diese Art gewinnt man vier Fractionen, deren erste aus Kühne's primären Albumosen besteht und durch Dialyse annähernd in Protalbumose und Heteroalbumose getrennt werden kann, während die drei anderen, welche Pick vorläufig secundäre Albumosen A, B, C genannt hat, zusammen dem Gemenge der Deuteroalbumosen früherer Untersucher entsprechen. Zu einer nach 24 stündigem Stehen abfiltrirten und genau neutralisirten Peptonlösung setzt man das gleiche Volum einer kaltgesättigten Ammonsulfatlösung

1) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, 1897, S. 246.

2) G. Kauder, Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. Archiv f. experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 20, S. 411.

3) Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Archiv f. experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 20, S. 426.

4) S. Lewith, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. I. Mittheilung. Archiv f. experim. Patholog. und Pharmak., Bd. 24, S. 1.

5) W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaugural-Dissertation, Strassburg 1898.

(vom specifischen Gewicht 1,253—1,255) hinzu, wodurch die primären Albumosen gefällt werden. Das mit Ammonsulfatlösung zu $\frac{2}{3}$ gesättigte Filtrat lässt die secundäre Albumose A ausfallen. Um die secundäre Albumose B niederzuschlagen, wird das $\frac{2}{3}$ gesättigte Filtrat mit feingepulvertem Ammonsulfat vollends gesättigt. Endlich fügt man zu dem dritten Filtrat $\frac{1}{10}$ Volum ammoniumsulfatgesättigter $\frac{1}{10}$ -normaler Schwefelsäure hinzu: die secundäre Albumose C setzt sich nach einigen Tagen ab. Nach der Trennung dieser vier Fractionen enthält die Flüssigkeit nur «echte» Peptone, von welchen Pick zwei, das alkoholunlösliche Pepton A und das alkohollösliche Pepton B, unterscheiden konnte.

Die Fällung der Albumosen durch Ammonsulfat ist wenigstens theilweise dadurch bedingt, dass dieses leichtlösliche Salz ihnen Wasser entzieht. Verschiedene Salze indessen, so unter anderen Zinksulfat und Kaliumacetat,¹⁾ besitzen (dem Gewichte nach) eine noch grössere Löslichkeit in Wasser und erscheinen darnach zu gleichem Zwecke verwendbar.

Nach Bömer²⁾ fällt eine gesättigte Zinksulfatlösung die Albumosen ebenso gut wie Ammonsulfat. Mit kleinen Mengen feingepulverten Zinksulfats erhält man zunächst einen starken flockigen Niederschlag, der zum grössten Theil aus Zinkphosphat gebildet ist und sich in wenig Salzsäure oder Salpetersäure löst. Wenn man daher die Albumosenlösung vorher leicht ansäuert, so bildet sich dieser Zinkphosphatniederschlag nicht. K. Baumann und Bömer³⁾ haben nun gefunden, dass die Fällung der Albumosen am vollkommensten erfolgt, wenn man auf je 100 ccm. ihrer Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirter Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzufügt. Sie sättigen die so angesäuerte Lösung in der Kälte mit feingepulvertem Zinksulfat, so dass sich nach 24stündigem

1) Vgl. übrigens S. Lewith, l. c.

2) A. Bömer, Zinksulfat, ein Fällungsmittel für Albumosen. Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. 34, S. 562.

3) K. Baumann und A. Bömer, Ueber die Fällung der Albumosen durch Zinksulfat. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel, Bd. I, 1898, S. 106.

Stehen Zinksulfatkrystalle wieder ausscheiden. Der Niederschlag wird dann auf ein Filter gebracht und mit einer schwach angesäuerten kaltgesättigten Zinksulfatlösung gewaschen. Das Filtrat enthält keine Spur Albumosen mehr, und die Peptone können daraus direkt durch Phosphorwolframsäure gefällt werden. Bei solchem Verfahren kann man dann den Albumosenstickstoff unmittelbar nach Kjeldahl bestimmen.

Es war wünschenswerth, zu erfahren, ob es auch mit Zinksulfat gelingt, die verschiedenen Albumosen, welche Pick mit Ammonsulfat erhalten hat, von einander zu trennen. Auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister habe ich mich mit der Frage beschäftigt und theile im Nachstehenden meine Erfahrungen mit.

Ich habe zunächst einige vorläufige Versuche angestellt. Aus einer neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung habe ich durch Fällung mit Ammonsulfat die verschiedenen Albumosen dargestellt, sie durch wiederholtes Lösen und Fällen, wie es Pick in seiner Arbeit vorschreibt, gereinigt, und ihre Fällungsgrenzen in wässriger Lösung mit Hülfe einer kaltgesättigten Zinksulfatlösung (specifisches Gewicht = 1,450)¹⁾ bestimmt. Nachdem ich auf diese Weise gefunden hatte, dass die isolirten Albumosen durch ungleiche Mengen Zinksulfat gefällt werden, habe ich versucht, ihre Fällungsgrenzen in Gemengen, neutralen oder sauren Witte-Peptonlösungen verschiedener Concentration, festzustellen.

Diese Lösungen wurden so hergestellt, dass das trockene Pepton mit heissem Wasser übergossen und die Flüssigkeit nach 24stündigem Stehen von der kleinen Menge des feinflockigen Bodensatzes abfiltrirt wurde. Das klare Filtrat reagirte immer alkalisch. Um es zunächst neutral zu machen, wurde tropfenweise verdünnte Schwefelsäure hinzugesetzt, sodann wurden zu je 100 ccm. der neutral gemachten Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirte Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzugefügt. Manchmal musste die Lösung nochmals filtrirt werden, nachdem ihr die gewünschte saure Reaction ertheilt worden war. Trotz mehrfacher Filtration waren die 20%igen Lösungen, besonders die neutralen, immer ein wenig trüb.

¹⁾ Das specifische Gewicht der kaltgesättigten Zinksulfatlösung wird regelmässig zu 1,450 gefunden, nur ausnahmsweise höher, bis 1,458.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Pick. In jeder Versuchsreihe wurde mittelst graduirter Büretten zu einem bestimmten Volum der Peptonlösung zunächst so viel destillirtes Wasser hinzugefügt, als nöthig war, das schliessliche Gesamtvolum auf 10 ccm. zu ergänzen, und dann eine von Probe zu Probe um 0,2 ccm. zunehmende Quantität der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zugesetzt. Die gleichmässige Mischung der Flüssigkeiten wurde durch gelindes Schütteln der Eprouvette unter Vermeidung von Schaumbildung erzielt. Die Concentration, bei der die erste bleibende Trübung eintrat, wurde als untere Fällungsgrenze angenommen. Der Inhalt der Eprouvetten wurde nach 24 Stunden, manchmal erst nach zwei Tagen, durch Doppelfilter abfiltrirt. Zu jedem Filtrate wurden 0,2 ccm. der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzugesetzt; das zuerst vollständig klar bleibende Filtrat ergab die obere Fällungsgrenze. Um die Fällungsgrenzen der nachfolgenden Fraction zu erhalten, wurde stets zuerst die vorhergehende abgeschieden. Um immer mit derselben Concentration an Pepton zu arbeiten, bin ich, nach dem Beispiele von Pick, so weit es möglich war, von einer Peptonmenge, die 2 ccm. der zuerst angewendeten Lösung entsprach, ausgegangen.

I. Fractionirungsversuche.

A. Bestimmung der Fällungsgrenzen der nach E. P. Pick dargestellten Albumosen in neutralen Lösungen.

Versuchsreihe I. Primäre Albumosen.

5%ige Lösung der primären Albumosen ccm.	Wasser ccm.	Zinksulfatlösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfatlösung	Bemerkungen
2	5	3	keine Trübung	—	Unt. Fällungsgrenze der primären Albumosen.
2	4,8	3,2	„	—	
2	4,6	3,4	„	—	
2	4,4	3,6	leichte Opalescenz	leichte Opalescenz	
2	4,2	3,8	Fällung	Opalescenz	
2	4	4	„	„	
2	3,8	4,2	„	schwache Opalescenz	
2	3,6	4,4	„	„	
2	3,4	4,6	„	„	

5%ige Lösung der pri- mären Albu- mosen ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3,2	4,8	„	sehr schw. Opalescenz	Ob. Fällungsgrenze der primären Albumosen.
2	3	5	„	klar	
2	2,8	5,2	„	„	
2	2,6	5,4	„	„	
2	2,4	5,6	„	„	
2	2,2	5,8	„	„	
2	2	6	„	„	

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, dass aus einer 5%igen Lösung die primären Albumosen bei einem Gehalt von 3,6 Volum kaltgesättigter Zinksulfatlösung in 10 Gesamtvolum auszufallen beginnen, und dass die Fällung bei halber Sättigung zu Ende ist.

Mit einer 2,5%igen Albumosenlösung wurden die Fällungsgrenzen bei 3,6 und 5,2 ccm. in 10 ccm. Gesamttlüssigkeit ermittelt.

Versuchsreihe II. Secundäre Albumose A.

Concentration der Albumosenlösung 2,5%. Verwendet für den einzelnen Versuch 2 ccm.

Die zur Verfügung stehende Menge der secundären Albumose A war nicht genügend, um eine 5%ige Lösung herzustellen, um so mehr, als die Versuchsreihe (wie auch sonst) mehrere Male wiederholt wurde. Uebrigens ändern sich, wie wir soeben für die primären Albumosen gesehen haben und wie es auch für die secundäre Albumose B nachweisbar ist, die Fällungsgrenzen durch diese Aenderung der Concentration nur unwesentlich.

Die untere Fällungsgrenze wurde bei einem Gehalt von 5,4 ccm. Zinksulfatlösung, die obere bei 6,8 ccm. auf 10 ccm. Gesamttlüssigkeit gefunden. Der Einfachheit wegen kann man den Zinksulfatgehalt der gesättigten Lösung gleich 1 setzen und analog den Ausdrücken Halbsättigung etc. die betreffende Con-

centration in vorliegendem Falle, als 0,54-, beziehungsweise 0,68-Sättigung, bezeichnen.

Versuchsreihe III. Secundäre Albumose B.

a) Concentration der Albumosenlösung 10%. Verwendet für den einzelnen Versuch 1 ccm.

Der Beginn der Fällung wurde bei 0,68-Sättigung, das Ende bei 0,86-Sättigung gefunden.

b) Concentration der Albumosenlösung 5%. Verwendet für den einzelnen Versuch 2 und 1 ccm.

Der Beginn der Fällung fand sich bei 0,7-Sättigung, das Ende der Fällung, zwischen 0,8- und 0,9-Sättigung gelegen, wurde nicht genauer bestimmt.

Versuchsreihe IV. Secundäre Albumose C.

Die kaltgesättigte Zinksulfatlösung gibt mit einer 5%igen Lösung der secundären Albumose C keine Trübung, selbst nach längerem Stehen. Sättigt man aber mit dem feingepulverten Salze, so erhält man nach 24 Stunden einen flockigen Niederschlag. Wiederholt man denselben Versuch, indem man einen Tropfen concentrirter Schwefelsäure hinzusetzt, so erscheint der flockige Niederschlag früher und ist in grösserer Menge vorhanden; das klare Filtrat davon trübt sich durch Zusatz eines Tropfens concentrirter Schwefelsäure nicht.

Aus den Versuchen, die soeben mitgetheilt wurden, ergibt sich, dass das Zinksulfat die verschiedenen Albumosen, welche Pick durch fractionirte Fällung mittelst Ammonsulfats isolirt hat, ebenfalls fällt. Der zu diesem Zwecke für 10 ccm. Gesamtlösung nöthige Gehalt ist 3,6 bis 5 ccm. der kaltgesättigten Lösung für die primären Albumosen, 5,4 bis 6,8 ccm. für die secundäre Albumose A, 6,8 bis 8,8 ccm. für die secundäre Albumose B, während die Deuteroalbumose C nur durch Sättigung mit dem feingepulverten Salze gefällt wird. Die Intervalle zwischen den Fällungsgrenzen sind viel geringer als bei der Ammonsulfatfällung, doch greift keine Fraction in die folgende ein.

Die verschiedenen Albumosen können auch mit einer Kaliumacetatlösung vom spezifischen Gewicht 1,350 vollständig gefällt werden. Die untere und obere Fällungsgrenze sind in diesem Fall 1,4 und 3 ccm. für die primären Albumosen, 3,2 und 4,4 ccm. für die Deuteroalbumose A, 6 und 7,6 ccm. für die Deuteroalbumose B. Die untere Fällungsgrenze der Deuteroalbumose C ist 8,6 ccm; die obere Fällungsgrenze konnte ich leider nicht mit Sicherheit feststellen. Sättigt man aber die Lösung der Deuteroalbumose C mit feingepulvertem Kaliumacetat, so trübt sich das klare Filtrat durch Zusatz von Eisessig nicht mehr.

Da das Kaliumacetat selbst mit ziemlich verdünnten Ammonsulfatlösungen einen krystallinischen Niederschlag gibt, so müssen die Albumosenlösungen, falls sie Ammonsulfat enthalten, vor der Fractionirung mit Kaliumacetat während einiger Tage dialysirt werden. Um Irrthümer in der Bestimmung der Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen zu vermeiden, muss das Kaliumacetat vorher von den Spuren von Kalksalzen, welche es oft enthält, befreit werden. Da man von Kaliumacetat nicht mit Sicherheit kaltgesättigte Lösungen von annähernd gleichem spezifischen Gewicht bereiten kann, habe ich, um stets unter denselben Bedingungen zu experimentiren, alle meine Versuche mit Lösungen vom spezifischen Gewicht 1,350 angestellt.

Auf Grund der vorliegenden Versuche liess sich hoffen, die Trennung der verschiedenen Albumosen in einer Witte-Peptonlösung durch Zinksulfat erreichen zu können. Die nachfolgend mitgetheilten Versuche bestätigten diese Erwartung.

B. Bestimmung der Fällungsgrenzen in neutraler Witte-Peptonlösung.

Versuchsreihe V.

5%ige neutrale Pepton- lösung ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung. ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3,6	4,4	keine Trübung	—	
2	3,4	4,6	leichte Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction I

5%ige neutrale Pepton- lösung ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
2	3,2	4,8	stärkere Opalescenz	—	
2	3	5	deutliche Trübung	leichte Opalescenz	
2	2,8	5,2	Fällung	,	
2	2,6	5,4	,	,	
2	2,4	5,6	,	,	
2	2,2	5,8	,	klar	Ob. Fällungsgrenze der Fraction I
2	2	6	,	,	

Durch einen Zinksulfatgehalt von 0,46-Sättigung ab wird also eine Fällung erzielt, die bei 0,58-Sättigung ihr Ende erreicht, und die ich vorläufig Fraction I nennen will.

Versuchsreihe VI.

Die Fraction I wird durch Zusatz von $1\frac{1}{2}$ Volumen der kaltgesättigten Zinksulfatlösung ausgefällt. Mit dem nach 24 stündigem Stehen gewonnenen, 0,6-gesättigten, klaren Filtrat wird die folgende Versuchsreihe angestellt:

0,6 ge- sättigtes, 5%iges neutrales Pepton- filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
1) 5 (2)	2,4	2,6 (5,6)	keine Trübung	—	
5 (2)	2,2	2,8 (5,8)	leichte Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction II

1) Die in Klammern beigegebene Zahl zeigt die der ursprünglichen Witte-Peptonlösung entsprechende Menge an.

2) Die zweite Zahl gibt den Gesamtsalzgehalt (Salzgehalt des 0,6-gesättigten Filtrates nebst zugesetztem Salze) an.

0,6 gesättigtes, 5%iges neutrales Pepton-filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink-sulfat-lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat-lösung	Bemerkungen
5 (2)	2	3 (6)	stärkere Opalescenz	—	
5 (2)	1,8	3,2 (6,2)	Trübung	leichte Opalescenz	
5 (2)	1,6	3,4 (6,4)	,	,	
5 (2)	1,4	3,6 (6,6)	,	,	
5 (2)	1,2	3,8 (6,8)	,	,	
5 (2)	1	4 (7)	,	,	
5 (2)	0,8	4,2 (7,2)	,	,	
5 (2)	0,6	4,4 (7,4)	,	klar	Ob. Fällungsgrenze der Fraction II
5 (2)	0,4	4,6 (7,6)	,	,	

Nach Ausfällung der Fraction I kann man durch einen Salzgehalt von 0,58-Sättigung ab einen zweiten Niederschlag erhalten, den ich als Fraction II bezeichnen will. Diese Fraction wird durch 0,74-Sättigung gänzlich gefällt.

Versuchsreihe VII.

Nachdem durch 2 Volume der kaltgesättigten Zinksulfatlösung die Fractionen I und II gefällt wurden, wird mit dem zu $\frac{2}{3}$ gesättigten Filtrate nachfolgende Versuchsreihe angestellt:

$\frac{2}{3}$ gesättigtes, 5%iges neutrales Pepton-filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink-sulfat-lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat-lösung	Bemerkungen.
6 (2)	1,6	2,4 (6,4)	keine Trübung	—	
6 (2)	1,4	2,6 (6,6)	schwache Opalescenz	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction III
6 (2)	1,2	2,8 (6,8)	starke Opalescenz	leichte Opalescenz	
6 (2)	1	3 (7)	Trübung	,	

$\frac{2}{3}$ gesättigtes, 5%iges neutrales Pepton- filtrat ccm.	Wasser ccm.	Zink- sulfat- lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrats gegen 0,2 ccm. Zinksulfat- lösung	Bemerkungen
6 (2)	0,8	3,2 (7,2)	„	„	
6 (2)	0,6	3,4 (7,4)	„	„	
6 (2)	0,4	3,6 (7,6)	„	„	
6 (2)	0,2	3,8 (7,8)	„	„	
6 (2)	—	4 (8)	„	„	
3 (1)	0,6	6,2 (8,2)	„	„	
3 (1)	0,6	6,4 (8,4)	„	„	
3 (1)	0,4	6,6 (8,6)	„	„	
3 (1)	0,2	6,8 (8,8)	„	klar	Ob. Fällungsgrenze der Fraction III.
3 (1)	—	7 (9)	„	„	

Es geht aus dieser Tabelle hervor, dass ein Gehalt an Zinksulfat von $\frac{2}{3}$ -Sättigung ab aus der neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung eine dritte Fraction zur Abscheidung bringt, die bei 0,88-Sättigung völlig ausgefällt ist.

Um dasselbe Gesamtvolum zu behalten, musste ich mich bei der Bestimmung der oberen Fällungsgrenzen mit nur 1 ccm. der Peptonlösung begnügen. Dagegen könnte man einwenden, dass die Filtrate bereits zu verdünnt gewesen seien, um ausreichend deutliche Opalescenzen zu geben. In diesem Falle hätte ich eine etwas zu niedrige obere Fällungsgrenze erhalten. Dies war aber nicht der Fall, da ich an 10- und 20%igen Peptonlösungen genau dieselbe obere Fällungsgrenze fand.

Versuchsreihe VIII.

Zu einem Volum Witte-Peptonlösung werden 9 Volume der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzugesetzt. Das so gewonnene klare Filtrat enthält die Fractionen I, II und III nicht mehr. Wird das Filtrat in der Kälte mit feingepulvertem Zinksulfat gesättigt, so trübt sich die Flüssigkeit deutlich. Nach 24stündigem Stehen wird die Flüssigkeit abfiltrirt. Wird zu dem klaren Filtrate ein Tropfen concentrirter Schwefelsäure hinzugefügt, so entsteht eine deutliche Trübung. Durch Zusatz von feingepulvertem Salz kann man also eine vierte Fraction isoliren. Diese wird nur unvollständig gefällt, wenn man von

neutraler Peptonlösung ausgeht; aus sauren Peptonlösungen hingegen kann man sie, wie später ersichtlich, vollständig abscheiden.

Vergleicht man die durch die fractionirte Fällung einer neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung mittelst Zinksulfats erhaltenen Ergebnisse mit denen der fractionirten Fällung durch Ammonsulfat, so ergibt sich, dass man in beiden Fällen vier Fractionen erhält, wovon die drei ersten durch das Salz allein gänzlich gefällt werden, während die vierte nur durch Zusatz von Säure zur salzgesättigten Flüssigkeit gänzlich zur Abscheidung kommt. Je nach der Art des verwendeten Salzes sind die Fällungsgrenzen der einzelnen Fractionen verschieden, wie sich dies aus der nachfolgenden Tabelle ergibt, in der die Fällungsgrenzen in Bruchtheilen der Sättigungsconcentration ausgedrückt sind.

	Fraction I		Fraction II		Fraction III	
	Ammon-sulfat	Zink-sulfat	Ammon-sulfat	Zink-sulfat	Ammon-sulfat	Zink-sulfat
Untere Fällungsgrenze	0,26	0,46	0,54	0,58	0,72	0,66
Obere Fällungsgrenze	0,44	0,58	0,62	0,74	0,95	0,88

Um die Fractionen I und II zu fällen, sind grössere Mengen der kaltgesättigten Zinksulfatlösung als der Ammonsulfatlösung erforderlich, während im Gegentheil die Fraction III durch ein geringeres Volumen Zinksulfat als Ammonsulfat gefällt wird. Bei Verwendung des Ammonsalzes liegen die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen weit genug von einander, um Trennung der verschiedenen Albumosen zu ermöglichen. Bei Benutzung von Zinksulfat beginnt jedoch die Fällung jeder Fraction gleich bei der oberen Fällungsgrenze der unmittelbar

vorhergehenden unteren Fraction (Fraction II) oder selbst vor dieser Grenze (Fraction III).¹⁾

E. P. Pick hat gezeigt, dass bei Anwendung von Ammonsulfat die Concentration der Witte-Peptonlösung kaum merklichen Einfluss auf die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen hat. Für die Fraction I (primäre Albumosen) lagen die Fällungsgrenzen, die er mit neutralen Peptonlösungen von verschiedenen Concentrationen erhielt, bei 0,22- bis 0,26-Sättigung als unterer Grenze einerseits und bei 0,44- bis 0,46-Sättigung als oberer Grenze anderseits.

Bei Fällung mit Zinksulfat ist jedoch die Concentration von grösserem Einfluss, wenigstens in Betreff der ersten Fraction, indem deren untere Fällungsgrenze umso mehr heruntergeht, je höhere Concentration die Peptonlösung aufweist. Was die anderen Fractionen betrifft, so verändern sich deren Fällungsgrenzen kaum, wie das aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht, in welcher wieder der Salzgehalt in Bruchtheilen der Sättigungsconcentration (= 1) ausgedrückt ist.

	Fraction I				Fraction II		Fraction III	
	2% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	10% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung	5% neutr. Lösung	20% neutr. Lösung
Untere Fällungsgrenze	0,46	0,46	0,36	0,32	0,58	0,58	0,66	0,66
Obere Fällungsgrenze	0,56	0,58	0,54	0,6	0,74	0,68	0,88	0,88

1) Mit einer Kaliumacetatlösung ($D = 1,350$) kann man ebenfalls aus der neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung vier Fractionen isoliren, wovon die drei ersten die untere Fällungsgrenze bei 2,4, 3,2 und 5,6 ccm. (in 10 ccm. Gesamtlflüssigkeit) aufweisen. Die oberen Fällungsgrenzen hingegen lassen sich sehr schwer feststellen; sie sind aber annähernd 3 ccm. für die Fraction I und 4,6 ccm. für die Fraction II, während es mir unmöglich war, sie für die Fraction III zu bestimmen. Ausser bei der ersten Fraction erfolgt die Fällung sehr träge. So z. B. sieht man bei Fraction III nach entsprechendem Salzzusatz in 48 Stunden erst leichte Opalescenzen. Durch Sättigung mit dem feingepulverten Salze

In allen Fällen wird die Fraction IV nur durch Sättigung mittelst feingepulverten Salzes gefällt; das klare Filtrat enthält dann aber noch stets nicht gefällte Albumosen.

C. Bestimmung der Fällungsgrenzen in saurer Witte-Peptonlösung.

Soeben haben wir gesehen, dass die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen, welche man mittelst der kaltgesättigten Zinksulfatlösung in neutralen 5- bis 20%igen Witte-Peptonlösungen bekommt, ineinandergreifen und dass nach Sättigung mit dem feingepulverten Salze im Filtrate noch ungefällte Albumosen zurückbleiben. Wie schon früher mitgetheilt, haben K. Baumann und Bömer festgestellt, dass die Fällung der Albumosen am vollständigsten ist, wenn man zu 100 ccm. der sie enthaltenden Lösung 2 ccm. Schwefelsäure (1 Volum concentrirte Schwefelsäure, 4 Volume Wasser) hinzusetzt. Ich habe daher auch die Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen in Lösungen von diesem Säuregehalt festgestellt.

In den ersten einschlägigen Versuchen habe ich die Peptonlösung allein angesäuert, was nicht ganz ohne Nachtheile ist. Wenn auch die kaltgesättigte Zinksulfatlösung stets eine leicht saure Reaction aufweist, so vermindert ihr Zusatz doch den relativen Säuregrad und zwar umsomehr, je mehr man hinzufügt, am meisten darnach bei Sättigung. Nun ist es natürlich zweckmässiger, unter ganz gleichen Bedingungen zu experimentiren. Deshalb habe ich auch die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen genauer so bestimmt, dass ich ausser der Peptonlösung auch die Zinksulfatlösung und das zur Ergänzung des Gesamtvolumens auf 10 ccm. benutzte destillirte Wasser zu gleichem Maasse (mit 2 ccm. verdünnter Schwefelsäure auf 100 ccm. Flüssigkeit) ansäuerte. Die Er-

in der Kälte wird die Fraction IV vollständig gefällt; das klare Filtrat trübt sich durch Zusatz einiger Tropfen Eisessig nicht mehr. Wenn man eine neutrale 20%ige Peptonlösung anwendet, so kann man die oberen Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen genau feststellen; die erste Fraction wird durch 0,18—0,21-Sättigung, die zweite durch 0,42- bis 0,52-Sättigung gefällt.

gebnisse dieser Versuche sind nachstehend kurz zusammengefasst.

Fractionen	1% Peptonlösung		2% Peptonlösung						3% Peptonlösung		4% Peptonlösung	
	alles sauer ¹⁾		neutr.		sauer ²⁾		alles sauer ¹⁾		alles sauer ¹⁾		alles sauer ¹⁾	
	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere
	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze
I	0,3	0,46	0,46	0,56	0,44	0,56	0,3	0,46	0,26	0,46	0,24	0,46
I a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II	0,58	0,66	—	—	—	—	0,58	0,64	0,58	0,64	0,56	0,62
III	0,76	0,86	—	—	—	—	0,76	0,82	0,72	0,82	0,68	0,76
IV	0,88	Sättig.	—	—	—	—	0,86	Sättig.	0,84	Sättig.	0,8	Sättig.
Die Ausfällung ist	vollständig ³⁾		—	—	—	—	vollständig		vollständig		vollständig	

Fractionen	5% Peptonlösung						10% Peptonlösung						20% Peptonlösung					
	neutr.		sauer ²⁾		alles sauer ¹⁾		neutr.		sauer ²⁾				neutr.		sauer ²⁾		alles sauer ¹⁾	
	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere
	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze	Fällungs- grenze
I	0,46	0,58	0,3	0,48	0,24	0,46	0,36	0,54	0,24	0,5	0,32	0,6	0,2	0,54	0,2	0,52	—	—
I a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	0,56	0,38	0,56	—	—
II	0,58	0,74	0,54	0,62	0,52	0,6	—	—	—	—	0,58	0,68	0,52	0,68	0,46	0,6	—	—
III	0,66	0,88	0,72	0,88	0,62	0,72	—	—	—	—	0,66	0,88	0,68	0,82	0,62	0,72	—	—
IV	—	Sättig.	—	Sättig.	0,74	Sättig.	—	—	—	—	—	Sättig.	—	Sättig.	0,74	Sättig.	—	—
Die Ausfällung ist	unvollständig ⁴⁾		vollständig		vollständig		—	—	—	—	unvollständig		vollständig		vollständig		vollständig	

Aus dieser Tabelle ergeben sich einige bemerkenswerthe Thatsachen. Zuerst sehen wir, dass, wenn man die Peptonlösung allein ansäuert, man die Fällungsgrenzen der Fraction I (insbesondere die untere) bedeutend und die der Fraction II

1) Peptonlösung, Salzlösung und Wasser angesäuert.

2) Bloss die Peptonlösung angesäuert.

3) Das Filtrat enthält keine Albumosen mehr.

4) Es bleiben ungefallte Albumosen zurück.

ein wenig herabsetzt, während die der anderen Fractionen sich kaum verändern. Säuert man aber alle Flüssigkeiten an (Pepton, Salz, Wasser), so werden die unteren und oberen Fällungsgrenzen der verschiedenen Fractionen bedeutend herabgesetzt. Was den Einfluss der Concentration betrifft, so ist er ähnlich dem bei den neutralen Peptonlösungen beobachteten. Die untere Fällungsgrenze sinkt für alle Fractionen, wenn die Concentration der Peptonlösung höher wird; die obere Fällungsgrenze bleibt constant für die Fraction I, wird etwas niedriger für die Fraction II und erheblich niedriger für die Fraction III.

Der grosse Vortheil der fractionirten Fällung mittelst Ammonsulfats besteht darin, dass die Fällungsgrenzen der verschiedenen Albumosen genügend weit von einander liegen, um deren bequeme Trennung zu ermöglichen. Wie schon bemerkt, ist dies bei Anwendung von Zinksulfat in neutralen Witte-Peptonlösungen nicht der Fall. Mit sauren Peptonlösungen von schwacher Concentration (1–5%) gelingt jedoch die Trennung der verschiedenen Fractionen durch die kaltgesättigte Zinksulfatlösung (ob sie angesäuert ist oder nicht), ebenso leicht wie durch Ammonsulfat. Um gut filtrirende Flüssigkeiten zu erhalten, ist es nöthig, die Proben so lange stehen zu lassen, bis die auf Zusatz von Zinksulfat zuerst aufgetretene Trübung sich in Flocken absetzt.

Ich erlaube mir hier auf die auffallende Aehnlichkeit der Ergebnisse aufmerksam zu machen, die man mit den verschiedenen Salzen, die bis jetzt zur fractionirten Fällung der Albumosen verwendet worden sind, Ammonsulfat, Zinksulfat, Kaliumacetat, erhalten hat. Wenn auch die Fällungsgrenzen andere sind, so ergibt sich doch stets dieselbe Anzahl Fractionen.

Pick hatte übrigens auch beobachtet, dass zwischen den Fractionen I und II sehr wahrscheinlich eine Zwischenfraction besteht. Durch Zinksulfatfällung konnte ich unter besonderen Concentrations- und Reactionsbedingungen diese Fraction schärfer bestimmen. Ich will sie vorläufig Fraction Ia nennen. Bei der Bestimmung der oberen Fällungsgrenze der Fraction I in einer sauren 20%igen Peptonlösung hatte ich bei den durch Zusatz

von 0,2 ccm. der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zu den klaren Filtraten entstehenden Trübungen Unregelmässigkeiten bemerkt. Die sehr deutlich entstandenen Trübungen nahmen erst zu, um nachher abzunehmen und in der 0,38- gesättigten Probe als eine sehr leichte Opalescenz ihr Minimum zu erreichen. Bei den nachfolgenden Proben wurde die Opalescenz erst stärker, verminderte sich nachher wieder und fehlte in der 0,52 gesättigten Probe ganz. Die von Anfang an sichtbaren Opalescenzen wurden nach $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde ein wenig stärker. Ich habe diese Beobachtung stets gemacht, so oft ich den Versuch mit der sauren 20%igen Peptonlösung wiederholte, gleichviel ob die Zinksulfatlösung und das Wasser angesäuert waren oder nicht. Auch fand Pick schon früher Nachtrübungen, die von der oberen Fällungsgrenze der Fraction I, nämlich 4,4 ccm. Ammonsulfatgehalt ab bis zu einem Ammonsulfatgehalt von 5,4 bis 6 ccm. auftreten. Es schien mir möglich, dass es sich um eine Zwischenfraction handelte, deren Fällungsgrenzen mit denen der Fractionen I und II zum Theile in einander greifen. Diese Vermuthung fand in nachfolgendem Versuch ihre Bestätigung:

0,45 gesättigtes 20%iges saures Peptonfiltrat ccm.	Wasser ccm.	Zink-sulfat-lösung ccm.	Nach dem Zusatz	Verhalten des Filtrates gegen 0,2 ccm. Zink-sulfatlösung	Bemerkungen
3,6 (2)	4,4	2 (3,6)	keine Trübung	—	Unt. Fällungsgrenze der Fraction Ia.
3,6 (2)	4,2	2,2 (3,8)	» »	—	
3,6 (2)	4	2,4 (4)	Fällung	—	
3,6 (2)	3,8	2,6 (4,2)	»	Opalescenz	
3,6 (2)	3,6	2,8 (4,4)	»	»	
3,6 (2)	3,4	3 (4,6)	»	»	
3,6 (2)	3,2	3,2 (4,8)	»	»	
3,6 (2)	3	3,4 (5)	»	»	
3,6 (2)	2,8	3,6 (5,2)	»	»	
3,6 (2)	2,6	3,8 (5,4)	»	»	
3,6 (2)	2,4	4 (5,6)	»	klar	Ob. Fällungsgrenze der Fraction Ia.
3,6 (2)	2,2	4,2 (5,8)	»	»	
3,6 (2)	2	4,4 (6)	»	»	

Aus dieser Versuchsreihe, die mehrfach wiederholt wurde, geht hervor, dass die Fraction Ia in sauren 20%igen Peptonlösungen durch Zinksulfat bereits, ehe die Fraction I vollständig abgeschieden ist, zu fallen beginnt und auch in die Fraction II eingreift.

Hieraus ergibt sich eine geringe Unsicherheit der Fällungsgrenzen bei der einschlägigen Concentration. Es ist möglich, dass wir deshalb eine etwas zu hohe obere Fällungsgrenze für die Fraction I finden, da ja stets ein Theil der Fraction Ia mitgefällt wird; vielleicht ist auch die obere Grenze der Fraction Ia zu hoch angenommen.

Weder aus sauren Peptonlösungen geringerer Concentration (2 und 5%) noch aus neutralen Lösungen (selbst zu 20%) konnten wir die Fraction Ia isoliren. Bei der fractionirten Fällung von Peptonlösungen verschiedener Concentration und Reaction durch Kaliumacetat oder Ammonsulfat sind wir nicht glücklicher gewesen. Die Fraction Ia kann daher nur in sehr kleinen Mengen im Witte-Pepton enthalten sein und wird für gewöhnlich entweder mit der Fraction I oder mit dieser und der Fraction II zusammen gefällt.

II. Charakterisirung der einzelnen Fractionen.

Ich habe weiter versucht, die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen, die man durch die fractionirte Fällung mittelst Zinksulfats erhält, festzustellen. Zu diesem Zwecke habe ich die einzelnen Fractionen aus einer, wie früher erwähnt, angesäuerten 20%igen Witte-Peptonlösung dargestellt. Um eine genügende Menge der Fraction Ia zu erhalten, musste ich eine grössere Menge Pepton verwenden.

300 gr. Pepton wurden in 1500 gr. Wasser gelöst. Die Lösung wurde abfiltrirt, genau neutralisirt, mit 2 ccm. verdünnter Schwefelsäure auf 100 ccm. Flüssigkeit angesäuert und dann wieder abfiltrirt. Das Filtrat wurde durch eine genügende Menge der kaltgesättigten Zinksulfatlösung zu 0,45 gesättigt und dann nach 24 Stunden abfiltrirt. Auf diese Weise erhielt ich einen Niederschlag, welcher der Fraction I entspricht. Diese Fraction wurde mit einer 0,45-gesättigten Zinksulfatlösung gewaschen

und nun wiederholt in Wasser gelöst, in gleicher Weise gefällt und ausgewaschen, endlich sorgfältig getrocknet. Ich bereitete eine 5%ige wässrige Lösung der so gereinigten Fraction I und liess einen Theil während 10 Tagen dialysiren. Dabei blieb ein Antheil der gelösten Substanz in Lösung, während der andere ausfiel; es sind dies Kühne's Protalbumose und Heteroalbumose.

Der durch Dialyse gewonnene Niederschlag wird in heissem Wasser gelöst, wobei ein grosser Theil als gelbe schmierige Masse (sogenannte Dysalbumose) zurückbleibt. Aus der abfiltrirten Flüssigkeit wird durch kaltgesättigte angesäuerte Zinksulfatlösung die Heteroalbumose wieder ausgefällt. Der so gewonnene weisse pulverige Niederschlag wird mit 96%igem Alkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst.

Zu dem bei der Dialyse in Lösung gebliebenen Theil fügt man das gleiche Volumen 96%igen Alkohols hinzu, wodurch der Rest der Heteroalbumose in Gestalt eines reichlichen Niederschlags erhalten wird. Die abfiltrirte alkoholische Flüssigkeit wird auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand, die Protalbumose enthaltend, wieder in Wasser aufgelöst, neuerlich mit dem gleichen Volumen 96%igen Alkohols versetzt, wodurch neuerdings etwas Heteroalbumose gefällt wird, das Filtrat dann noch mehrere Male in gleicher Weise behandelt, bis die wässrige Protalbumoselösung bei Zusatz des gleichen Volumens 96%igen Alkohols keine Spuren Heteroalbumose mehr ausfallen lässt. Dieses Verfahren zur Reinigung der Protalbumose gründet sich auf Erfahrungen von Herrn Dr. E. P. Pick, über welche dieser in nächster Zeit selbst berichten wird.

Zu dem nicht dialysirten Theil der Fraction I setzt man das gleiche Volumen 96%igen Alkohols hinzu, wodurch man einen reichlichen weissen, nur zum Theile in Wasser löslichen Niederschlag erhält, der ein Gemisch von Dysalbumose, Heteroalbumose und Zinksulfat darstellt. Das Filtrat, welches Protalbumose neben wenig Heteroalbumose enthält, wird von der letzteren nach dem eben mitgetheilten Verfahren befreit.

Um die Fraction Ia zu gewinnen, setzt man zu dem

durch Fällung der Fraction I erhaltenen Filtrate 22 $\frac{2}{9}$ % seines Volums an kaltgesättigter Zinksulfatlösung hinzu, so dass man ein 0,55-gesättigtes Gemisch bekommt. Der erzielte Niederschlag wird mit einer 0,55-gesättigten Zinksulfatlösung gewaschen, dann durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Zinksulfatlösung der angeführten Concentration von anhängenden Resten der Fractionen I und II gänzlich befreit, endlich sorgfältig getrocknet.

Um die Fractionen II und III zu isoliren, setzt man den Filtraten der Fractionen Ia und II $\frac{1}{2}$ respective $1\frac{1}{2}$ Volume der kaltgesättigten Zinksulfatlösung hinzu, so dass man 0,7- und 0,88-gesättigte Lösungen erhält. Um die Fraction IV zu fällen, sättigt man das Filtrat der Fraction III mit feingepulvertem Zinksulfat. Die Fractionen II, III und IV werden auf dieselbe Weise wie die Fraction Ia gereinigt. Ich habe die verschiedenen Niederschläge immer in der Anfangs benutzten Wassermenge (1500 ccm.) gelöst und mit 2 ccm. Säure auf 100 ccm. Flüssigkeit angesäuert. So war stets die anfängliche Concentration wiederhergestellt und damit eine Veränderung der Fällungsgrenzen bei den verschiedenen Fractionen vermieden.

Das nach der Fällung der Fraction IV verbleibende klare Filtrat trübt sich durch Zusatz von Zinksulfat nicht mehr. Es enthält keine Albumosen mehr, gibt aber noch eine charakteristische Biuretreaction. Durch Fällung eines Theiles dieses Filtrates nach dem Vorgehen von Pick mit einer zinksulfat-gesättigten Lugol'schen Flüssigkeit kann man daraus zwei Körper, einen alkoholunlöslichen und einen alkohollöslichen, isoliren. Um diese zwei Fractionen zu trennen, habe ich ein Verfahren benutzt, das die Nachtheile der Fällung durch Jodkaliumlösung vermeidet.

Das Filtrat wird durch Zusatz von feingepulvertem Zinkoxyd neutralisirt, dann auf dem Wasserbad zu einem kleinen Volum eingedampft und nach 24stündigem Stehen von dem reichlichen krystallinischen Niederschlag abfiltrirt. Das klare Filtrat gibt die Biuretreaction, enthält aber noch immer Zinksalz. Man erwärmt es auf dem Wasserbad, fügt ein Volum 96%igen Alkohols hinzu und erhält so neuerlich einen Nieder-

schlag, den man von dem in Alkohol gelösten Theile abfiltrirt. Dieser Niederschlag wird in Wasser gelöst und wiederholt mit Alkohol ausgezogen. Auf diese Weise trennt man das Filtrat von der Fraction IV in einen alkoholunlöslichen und einen alkohollöslichen Theil.

Zu dem in Wasser gelösten alkoholunlöslichen Niederschlag (Fraction V) setzt man tropfenweise Ammoniak hinzu, bis in der überstehenden Flüssigkeit kein Niederschlag mehr erfolgt. Das Filtrat gibt allein die Biuretreaction. Durch Zusatz von feingepulvertem Chlorbaryum wird es von Schwefelsäure befreit. Fügt man zu dem neuen so gewonnenen Filtrate 5 bis 6 Volumen 96%igen Alkohols hinzu, so erhält man die Fraction V als einen weissen, flockigen Niederschlag, den man durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen durch Alkohol reinigt und endlich sorgfältig trocknet.

Der alkohollösliche Theil (Fraction VI) wird durch wiederholtes Abdampfen auf dem Wasserbad, Lösen in Wasser und Fällen mit 96%igem Alkohol von zurückgehaltenem Zinksalz gereinigt und endlich sorgfältig getrocknet.

In der nachfolgenden Tabelle (s. Seite 240 uff.) theile ich die Reactionen mit, welche die wässerigen 5%igen Lösungen der verschiedenen, durch die fractionirte Fällung mittelst Zinksulfats aus dem Witte-Pepton isolirten Körper darboten.

Die Fractionen I^a, II, III und IV enthielten Spuren von Zinksulfat, während die anderen davon gänzlich frei waren. Da Zinksulfat mit Ferrocyankalium und starkem Alkohol Niederschläge gibt, musste darauf Bedacht genommen werden, dass seine Anwesenheit die betreffenden Reactionen stören konnte. Doch war der Gehalt daran so gering, dass er sich nur bei der Probe mit Ferrocyankalium geltend machte. Ich bin daher nicht in der Lage, über das Verhalten der betreffenden Fractionen gegen dieses Reagens zu berichten.

Die Heteroalbumose ist schwer in Wasser löslich und gibt, wie bekannt, keine ganz klaren Lösungen.

Aus dieser Tabelle erhellen verschiedene beachtenswerthe Thatsachen.

Vorerst entsprechen die Fractionen II, III, IV und V den Deuteroalbumosen A, B, C und dem Pepton A von Pick. Es scheint mir derzeit nicht berechtigt, den geringen Unter-

schieden, welche die Deuteroalbumosen A, B, C meiner Darstellung bei Prüfung mit Trichloressigsäure den Angaben Pick's gegenüber aufweisen, Gewicht beizulegen, zumal durch die angewandte Darstellungsmethode die Reinheit der einzelnen Albumosen trotz aller Bemühungen nicht soweit verbürgt erscheint, um jede Spur von fremden Beimengungen auszuschliessen.

Die Fraction Ia zeigt im grossen Ganzen die Reactionen der Deuteroalbumose A. Sie scheint sich jedoch den primären Albumosen zu nähern, wie dies die mit Kupferacetat,¹⁾ Trichloressigsäure, Jodquecksilberkalium²⁾ und Bleiacetat erhaltenen Reactionen anzeigen. Andererseits verhält sie sich gegenüber verdünntem Kupfersulfat wie die secundären Albumosen B und C, während die Deuteroalbumose A in diesem Falle ein den primären Albumosen entsprechendes Verhalten zeigt. Zu beachten ist, dass ich leider die Fraction Ia in zu geringer Menge erhielt, um sie gänzlich von anhaftenden Resten, sowohl der primären Albumosen als der Deuteroalbumose A, befreien zu können. Wie dem auch sei, sehe ich mich doch im Hinblick auf die Fällungsgrenzen und die oben angeführten Reactionen genöthigt, diese Fraction als eine mit der Deuteroalbumose A nicht identische Substanz anzusehen. Ich schlage vor, sie vorläufig als Deuteroalbumose A α und die Deuteroalbumose A von Pick als Deuteroalbumose A β zu bezeichnen.

Die Fraction VI gibt genau dieselben Reactionen wie das Pepton B von Pick. Jedoch unterscheidet sie sich davon durch den positiven Ausfall der Millon'schen und der Xanthoproteinreaction. Sie gibt mit Bromwasser einen reichlichen Niederschlag.

Aus Vorstehendem geht hervor, dass man durch die fractionirte Fällung des Witte-Peptons mittelst Zinksulfats dieselben Fractionen erhält wie durch fractionirte Fällung dieses Körpers mittelst Ammonsulfats. In beiden Fällen erzielt man eine ziemlich beträchtliche Ausbeute an primären Albumosen

¹⁾ Die gleiche Reaction, welche die Heteroalbumose gibt.

²⁾ Die gleiche Reaction, welche die Protalbumose gibt.

Reagens	Fraction I		Fraction Ia
	Heteroalbumose	Protalbumose	Deuteroalbumose A α
1. Alkohol 96%.	Mit dem gleichen Volumen Fällung, die sich in der Hitze nicht verändert.	Bei grossem Ueberschuss Opalescenz; in der Hitze Flockenabscheidung.	Fällung; in der Hitze Flockenabscheidung.
2. Salpetersäure in der Kälte.	Trübung, welche in der Hitze verschwindet, in der Kälte wieder erscheint.	Erst bei Kochsalzzusatz Trübung.	Leichte Trübung; viel deutlicher bei Kochsalzzusatz.
3. Gleiches Volum concentrirter Kochsalzlösung zu der mit Essigsäure angesäuerten Lösung gesetzt.	Starke Trübung, die beim Erhitzen verschwindet.	Opalescenz, die beim Erhitzen schwindet, beim Abkühlen wieder erscheint.	Starke Trübung; nach einigem Stehen weisser Niederschlag.
4. Aussalzen der neutralen Lösung mit Kochsalz.	Opalescenz und Fällung.	Opalescenz und Fällung.	Opalescenz und Fällung.
5. Aussalzen der mit Essigsäure angesäuerten Lösung mit Kochsalz.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat Trübung.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat keine Trübung.	Starke Fällung, im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.
6. Verdünnte Kupfersulfatlösung.	Starke Fällung.	Kaum eine Andeutung von Trübung.	Klar, selbst bei neutraler Reaction und nach längerem Stehen.
7. Verdünnte Kupferacetatlösung.	Starke Fällung.	Sehr leichte Trübung.	Starke Fällung.
8. Essigsäure-Ferrocyankalium.	Starke Fällung, in der Hitze löslich, beim Abkühlen wieder auftretend.	Starke Fällung, in der Hitze löslich, beim Abkühlen wieder auftretend.	
9. Trichloressigsäure.	Sehr leichte Trübung, in der Hitze verschwindend, in der Kälte wieder erscheinend.	Kaum eine Andeutung von Trübung.	Leichte Trübung.

Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI
Deutero- albumose A β	Deutero- albumose B	Deutero- albumose C	Pepton A	
Fällung; in der Hitze Flocken- abscheidung.	Bei grossem Ueberschuss Opalescenz, die sich in der Hitze nicht verändert.	Bei grossem Ueberschuss starke Opalescenz; in der Hitze Flocken- abscheidung.	Fällt im Ueberschusse.	Bei grossem Ueberschuss Trübung, die sich in der Hitze nicht verändert; nach längerem Stehen gelbe Ausscheidung.
Erst bei Kochsalzzusatz, beinahe bis zur Sättigung, Trübung.	Erst bei Koch- salzsättigung Trübung.	Selbst bei Koch- salzsättigung keine Trübung.	Selbst bei Koch- salzsättigung keine Trübung.	Selbst bei Koch- salzsättigung keine Trübung.
Starke Trübung; nach einigem Stehen weisser Niederschlag.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Opalescenz und Fällung.	Leichte Opalescenz.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Starke Fällung; im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.	Fällung u. leichte Opalescenz; im Filtrate auf Zusatz von Zinksulfat starke Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Klar, bei neutra- ler Reaction nach längerem Stehen Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.
			Keine Trübung.	Leichte Fällung.
Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.	Keine Trübung.

Reagens	Fraction I		Fraction Ia
	Heteroalbumose	Protoalbumose	Deuteroalbumose Aα
10. Almén'sche Reaction.	Starker Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen geringer Niederschlag, der sich im Ueberschusse löst.	
11. Jodquecksilberkalium.	Erst in saurer Lösung Trübung, die sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure nicht löst.	1 Tropfen gibt starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure fast gänzlich löst.	1 Tropfen gibt starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure theilweise löst.
12. Millon'sche Reaction.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.
13. Xanthoproteinprobe.	Erst beim Erhitzen Gelbfärbung	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.
14. Adamkiewicz'sche Reaction.	Violett-färbung.	Violett-färbung.	Violett-färbung.
15. Molisch'sche Zuckerprobe.	Schwach positiv.	Schwach positiv.	Positiv.
16. Biuretprobe mit Kupfersulfat.	Positiv.	Positiv.	Positiv.
17. Biuretprobe mit Nickelsulfat.	Gelbfärbung.	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schöne Gelbfärbung.
18. Kochen mit Alkali und Bleiacetat.	Schwache Braunfärbung.	Schwache Braunfärbung.	Braunfärbung.

Fraction II	Fraction III	Fraction IV	Fraction V	Fraction VI
Deutero- albumose A β	Deutero- albumose B	Deutero- albumose C	Pepton A	
Starker Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich nicht im Ueberschusse löst.	Trübung, sich beim Erwärmen lösend, beim Abkühlen wieder ausfallend; nach längerem Stehen Niederschlag, der sich im Ueberschusse löst.	Starke Fällung, die sich im Ueberschusse löst.
1 Tropfen gibt einen starken Niederschlag, der sich im grossen Ueberschuss von Salzsäure nicht löst.	Sehr starke Fällung; in grossem Ueberschuss von Salzsäure löslich.	Starke Fällung; in geringem Ueberschuss von Salzsäure löslich.	Starke Fällung, die sich in Salzsäure sehr leicht löst.	1 Tropfen gibt einen starken Niederschlag, der sich in Salzsäure sehr leicht löst.
Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Weisse Fällung, beim Kochen Röthung.	Fällung, beim Kochen Rothfärbung.	Sehr schwache, beinahe keine Trübung; bei längerem Kochen blasse Rosafärbung.	Sehr schöne Rothfärbung.
Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.	Beim Kochen sehr schwache Gelbfärbung.	Schon in der Kälte Gelbfärbung.
Violettffärbung.	Violettffärbung.	Violettffärbung.	Rothfärbung.	Negativ.
Positiv.	Positiv.	Positiv.	Sehr schöne karminrothe Färbung.	Negativ.
Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.	Positiv.
Schöne Gelbfärbung.	Gelbfärbung.	Beim Erwärmen Gelbfärbung.	Schwache Gelbfärbung.	Gelbfärbung.
Intensive schwarzbraune Färbung.	Nach kurzem Kochen Braun- gelbfärbung, später geringe Ausscheidung von Schwefelblei.	Selbst nach längerem Kochen negativ.	Selbst nach längerem Kochen negativ.	Selbst nach längerem Kochen negativ.

und an Deuteroalbumose B, eine viel geringere an Deuteroalbumose A β und eine sehr kleine an Deuteroalbumose C. Ausserdem lässt sich mittelst Zinksulfats noch eine weitere Fraction, die Deuteroalbumose A α , wovon jedoch nur eine minimale Menge in dem Witte-Pepton enthalten ist, isoliren. Das Gemisch der Deuteroalbumosen besteht demnach aus wenigstens vier verschiedenen Körpern.

Wenden wir uns jetzt wieder zu den primären Albumosen. Durch das oben mitgetheilte, im Wesentlichen von E. P. Pick ausgearbeitete Verfahren habe ich sehr reine Heteroalbumose und Protalbumose gewinnen können. Diese beiden Körper weisen in ihrem Verhalten gegen Alkohol, kalte und kochende Salpetersäure, Sättigung mit Chlornatrium, gegen verdünntes Kupfersulfat und Kupferacetat, Jodquecksilberkalium und das Almén'schen Reagens wesentliche Unterschiede auf. Dabei sind drei Momente besonders beachtenswerth.

Vorerst gibt die Heteroalbumose auf Hinzufügung einiger Tropfen verdünnter Salpetersäure in der Kälte eine recht deutliche Trübung, während die Protalbumosenlösung vollständig klar bleibt. Ich glaube annehmen zu dürfen, dass die unter gleichen Bedingungen sonst in Protalbumosenlösungen erhaltenen Trübungen einzig von dem Vorhandensein einer kleinen Menge von darin enthaltener Heteroalbumose herrühren. Was diese Meinung unterstützt, ist die Angabe Folin's,¹⁾ betreffend eine Albumose, deren Lösung in der Kälte nicht durch Salpetersäure getrübt würde, obgleich sie sonst die der Protalbumose eigenthümlichen Reactionen aufwies.

Eine zweite Thatsache, auf die ich die Aufmerksamkeit lenken möchte, ist, dass, während in Heteroalbumosenlösung ein einziger Tropfen verdünnter Kupfersulfat- oder Kupferacetatlösung sofort einen reichlichen Niederschlag bewirkt, Protalbumosenlösung sich nach Zusatz von mehreren Tropfen dieser Reagentien nur sehr wenig trübt. Wenn man zu einer neutralen 5%igen Witte-Peptonlösung tropfenweise eine verdünnte

¹⁾ Otto Folin, Ueber einige Bestandtheile von Witte's Pepton. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898, S. 152.

Kupfersulfatlösung so lange zusetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht, so gibt das nach 24stündigem Stehen erzielte klare blaugefärbte Filtrat auf Zusatz eines gleichen Volumens der kaltgesättigten Zinksulfatlösung noch einen sehr reichlichen Niederschlag. Ein gleiches Ergebniss wird erzielt, wenn man sich für denselben Versuch einer verdünnten Kupferacetatlösung bedient. Demnach fällt die verdünnte Kupfersulfat- und Kupferacetatlösung nur die Heteroalbumose ausgiebig.¹⁾ Aehnlich lässt sich zeigen, dass die verdünnte Kupfersulfatlösung die Deuteroalbumose A β aus neutraler Lösung vollständig fällt, nicht aber die Deuteroalbumosen B und C.

Endlich ist das Verhalten der beiden primären Albumosen gegenüber dem Almén'schen Reagens sehr bemerkenswerth. Während die Protalbumose sich dabei wie die echten Peptone verhält, d. h. einen im Ueberschuss des Reagens löslichen Niederschlag liefert, zeigt die Heteroalbumose dieselbe Reaction wie die Deuteroalbumosen. Folin ist der einzige Autor, der bis jetzt eine primäre Albumose erhielt, welche mit dem Almén'schen Reagens wie die echten Peptone reagierte.²⁾ Das scheint zu ergeben, dass der Körper, den Folin in sehr kleinen Mengen aus Witte-Pepton nach Ausdialysiren der Heteroalbumose und Ausfällung durch Bleiacetat erhielt, hauptsächlich aus sehr reiner Protalbumose bestand. Warum der relativ alkohollösliche Theil der primären Albumosen der Protalbumose Kühne's gleichzusetzen ist, wird von Herrn Dr. E. P. Pick näher auseinandergesetzt werden.

1) Folin (l. c. S. 155) hatte schon früher gefunden, dass die primären Albumosen weder durch Kupferacetat noch durch Kupfersulfat quantitativ gefällt werden.

2) R. Neumeister, Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone, Zeitschr. f. Biol., N. F., Bd. 8, 1890, S. 344. — Wenn man einer Lösung «echten» Peptons einen Tropfen des Almén'schen Reagens zusetzt, so trübt sich die Flüssigkeit. Nach 24stündigem Stehen hat sich ein leichter Niederschlag gebildet, der sich im Ueberschusse des Reagens auflöst. Der bei den Deuteroalbumosen erhaltene Niederschlag löst sich nicht im Ueberschusse des Reagens auf.

III. Die Fällungsgrenzen der peptischen Verdauungsprodukte des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, des Serumglobulins und des Caseins bei Verwendung von Zinksulfat.

Umber¹⁾ hat es versucht, mit Hülfe von Ammonsulfat die Trennung der Albumosen des krystallisirten Eier- und Serumalbumins und des Serumglobulins, Alexander²⁾ jene der Albumosen des Caseins durchzuführen. Sie erhielten dabei für jeden der genannten Eiweisskörper 4 Fractionen, entsprechend dem Gemenge der primären Albumosen und den 3 secundären Albumosen von E. P. Pick.

Es war nach den Erfahrungen am Witte-Pepton zu erwarten, dass das Zinksulfat auch in diesen Fällen das Ammonsulfat zu ersetzen vermöchte.

Zu diesem Zwecke stellte ich mir krystallisirtes Eieralbumin nach Hofmeister³⁾, krystallisirtes Serumalbumin nach Gürber,⁴⁾ Serumglobulin nach Kauder⁵⁾ und Reye⁶⁾ dar.

1) F. Umber, Die Spaltung des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898, S. 258.

2) F. Alexander, Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898, S. 411.

3) F. Hofmeister, Ueber jodirtes Eialbumin. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, 1897, S. 159.

Meine Versuche, krystallisirtes Eialbumin nach dem Verfahren von Hopkins (F. G. Hopkins and S. N. Pinkus, Observations on the crystallization of animal proteids. Journal of Physiology, Vol. XXIII, 10. Juni 1898, Nr. 1—2) darzustellen, verliefen nicht ganz nach Wunsch. Zwar gelang es stets schon nach 24 Stunden einen reichlichen krystallinischen Niederschlag, nur mit spärlichen amorphen Beimengungen verunreinigt, zu erhalten. Wurde er aber nicht sofort abfiltrirt, so verlor er seine Löslichkeit, so dass eine weitere Reinigung durch Umkrystallisiren nicht durchführbar war. Aber auch wenn man die erhaltenen schönen Krystalle möglichst bald wieder löste und umzukrystallisiren versuchte, kam es vor, dass die Krystallisation ausblieb und selbst auf Zusatz von vorrätig gehaltenen Krystallen nicht mehr eintrat.

4) Gürber, Krystallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. d. physik. med. Ges. z. Würzburg, 1894.

5) Kauder, l. c.

6) Reye, l. c.

Reines, nach Hammarsten's ¹⁾ Vorschrift bereitetes Casein lieferte mir Merck in Darmstadt.

Die reinen Eiweisskörper wurden in 2%igen Lösungen der Einwirkung von 0,4%iger concentrirter Salzsäure und von Grubler's Pepsinum purissimum (0,05 gr. auf 10 ccm.) bei 38—40° überlassen. Sie gingen rasch in Lösung; nur das Eialbumin und das Serumglobulin hinterliessen einen geringen flockigen Niederschlag. Die Verdauung wurde unterbrochen, sobald an abgenommenen Proben nach Sättigung mit Zinksulfat die Anwesenheit von Peptonen nachweisbar war. Dann wurde das Filtrat sorgfältig mit verdünnter Natronlauge neutralisirt ²⁾ und nachher mit verdünnter Schwefelsäure in oben angegebener Weise (2 ccm. auf 100 ccm.) angesäuert. An den völlig klaren Lösungen wurden die Fällungsgrenzen mit angesäuerter Zinksulfatlösung, wie oben beschrieben, genau bestimmt. Das Ergebniss der Versuche ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich. Die Zahlen geben den Grad der Sättigung mit Zinksulfat an, die Concentration der kaltgesättigten Lösung gleich eins gesetzt.

Fractionen	kryst. Eiweiss		kryst. Serumweiß		Serumglobulin		Casein	
	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere
	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze	Fällungsgrenze
primäre Albumosen	0,24	0,46	0,24	0,48	0,26	0,46	0,28	0,44
Deuteroalbumose A	0,64	0,68	0,52	0,60	0,58	0,72	0,54	0,66
„ B	0,72	0,82	0,72	0,82	0,74	0,84	0,74	0,84
„ C	0,84	Sättig.	0,88	Sättig.	0,88	Sättig.	0,90	Sättig.

Wie die Tabelle lehrt, gelingt mit Hülfe von Zinksulfat in allen Fällen die Trennung von 4 Fractionen ebenso leicht, wie mittelst Ammonsulfat.

Umber und Alexander haben in den Fällungsgrenzen gegen Ammonsulfat für bestimmte Albumosen des Globulins und

¹⁾ O. Hammarsten, Verhandlungen der kgl. schwed. Akad. der Wissenschaften, Upsala 1877.

²⁾ Die Verdauung dauerte in allen Fällen so lange, bis kein Neutralisationspräcipitat mehr erhalten wurde.

des Caseins kleine Abweichungen gegenüber den Albumosen des Fibrins (Witte-Pepton) gefunden. Solche Unterschiede treten zum Theil auch bei Verwendung von Zinksulfat hervor. Wie Umber mit Ammonsulfat, habe ich auch mit Zinksulfat die Fällungsgrenzen der secundären Albumose A des Globulins höher gefunden als bei der entsprechenden Fraction des Witte-Pepton, während ich Aehnliches bei der gleichen Fraction am Casein nicht sicherstellen konnte. Dagegen fand ich auch für die secundäre Albumose A aus Eialbumin höhere Fällungsgrenzen, näher denen des Globulins, was Umber bei seinem Verfahren nicht bemerkte. Es wäre von Bedeutung, festzustellen, ob diese Unterschiede von der Quantität der betreffenden Albumose abhängig sind oder von deren abweichender chemischen Beschaffenheit. Dann ist aber auch an die Möglichkeit zu denken, dass eine Zwischenfraction, der von mir am Witte-Pepton isolirten Deuteroalbumose A_α entsprechend, je nach der Menge in der sie auftritt, die Fällungsgrenzen beeinflusst, und dass diese Unterschiede je nach dem Stadium der Verdauung ungleich deutlich hervortreten.

Mit Ausnahme der Deuteroalbumose A, sind die Fällungsgrenzen für die Albumosen der verschiedenen Eiweisskörper nahezu identisch.

Noch sei bemerkt, dass es nöthig war, um die untere Fällungsgrenze der ersten Fraction beim Eialbumin und Globulin scharf zu bestimmen, die Verdauungsflüssigkeit zunächst mit saurer kaltgesättigter Zinksulfatlösung bis zu 0.1-Sättigung zu versetzen und so die Reste von Acidalbumin zu beseitigen, welche sonst mit der ersten Albumosenfraction zur Ausfällung gelangen.

Hammarsten¹⁾ hat gegen das Unterscheiden von Albumosen und Peptonen auf Grund des Verhaltens gegen ein einziges Salz, das Ammonsulfat, Bedenken erhoben. Dasselbe Bedenken kann umsomehr gegen die Unterscheidung verschiedener secundärer Albumosen, wie sie E. P. Pick, dann Umber und Alexander durchgeführt haben, erhoben werden. Allein, abgesehen davon, dass, wie schon die angeführten

¹⁾ Olof Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie. 3. Auflage, Wiesbaden, 1895, S. 32.

Beobachter gezeigt haben, die einzelnen so isolirten Fractionen nicht bloss in den Fällungsgrenzen, sondern auch in ihren Löslichkeitsverhältnissen und Reactionen Verschiedenheiten darbieten, so lehren die vorstehenden Untersuchungen, dass sich mit Hülfe eines ganz anderen Trennungsmittels, des Zinksulfats, dieselben Fractionen, und zwar mit dem gleichen reactionellen Verhalten isoliren lassen. Hiermit erscheint die Vielheit der peptischen Verdauungsprodukte neuerdings sichergestellt und zugleich ein neuer, vielleicht bequemerer Weg zu ihrer Isolirung gegeben.

Da über die Reindarstellung, Zusammensetzung und die Spaltungsprodukte der einzelnen Albumosen ausführliche Mittheilungen von befreundeter Seite in nächster Aussicht stehen, so habe ich meine Untersuchungen nicht in dieser Richtung weiter geführt, sondern auf Anregung von Herrn Professor Hofmeister den Versuch gemacht, die Zinksulfatmethode zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Albumosen in den verschiedenen Stadien der Peptonisation zu benutzen. Die in mehrfacher Richtung überraschenden Resultate dieser Untersuchung bilden den Gegenstand einer in Kürze folgenden Mittheilung.

Phosphorsäureausscheidung nach Castration.¹⁾

Von

Fr. N. Schulz und O. Falk.

(Aus dem physiologischen Institut zu Jena; chemische Abtheilung).

(Der Redaction zugegangen am 2. April 1899.)

Zwei italienische Forscher, Curàtulo und Tarulli,²⁾ haben bei gesunden Hündinnen die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn vor und nach der Castration bestimmt. In drei ausgeführten Versuchen wurde übereinstimmend nach der Castration eine Abnahme der Phosphorsäureausscheidung im Harn um fast die Hälfte beobachtet. Diese verminderte Ausscheidung hielt bei allen drei Versuchsthieren während der ganzen Beobachtungsdauer an. Das am längsten beobachtete Thier, eine Hündin von ca. 9 kgr. Gewicht, schied in der 211 tägigen Beobachtungszeit nach der Castration 169 gr. P_2O_5 weniger aus, als nach der Vorperiode zu erwarten war. Curàtulo und Tarulli machen die Annahme, dass diese verminderte Ausscheidung im Harn auf eine Retention von Phosphorsäure im Organismus zurückzuführen sei; sie bringen

1) Eine eingehende Mittheilung der Versuche wird der eine von uns (Dr. Falk) demnächst in einer gynäkologischen Zeitschrift folgen lassen.

2) Curàtulo und Tarulli:

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1. Centralblatt für Physiologie
1895. Bd. IX, Nr. 4, S. 149—152. | } vorläufige Mittheilungen. |
| 2. Centralblatt für Gynäkologie
1895. S. 555 | |
| 3. La secrezione interna delle ovaie. Roma 1896 Tipografia Fratelli Centenari (ausführliche Mittheilung). | |

dieselbe in ursächlichen Zusammenhang mit der Castration und glauben so eine Erklärung für die Heilwirkung der Castration bei Osteomalacie gefunden zu haben.

Bei der eingehenden Berücksichtigung, welche diese Angaben in der gynäkologischen Litteratur gefunden haben, erschien uns eine Nachprüfung angebracht, zumal da sich gegen die Versuchsergebnisse gewichtige Bedenken erheben lassen. Zunächst ist es als fast unmöglich zu bezeichnen, dass ein Thier derartige kolossale Mengen von Phosphor im Organismus anhäuft. Organische Phosphorverbindungen sind wegen ihres geringen P-Gehaltes, wenigstens für die Hauptmasse des in Frage kommenden Phosphors, völlig auszuschliessen: es könnte sich höchstens um eine Ablagerung der Phosphorsäure als phosphorsaurer Kalk handeln, wie sie ja auch von den italienischen Forschern angenommen wird. In dem am längsten fortgesetzten Versuche müsste sich das Knochen-system gerade verdoppelt haben. Da am Ende der Versuchsreihe die P_2O_5 -Ausscheidung noch auf die Hälfte der normalen Ausscheidung herabgesetzt war, die Phosphorsäureretention also noch anhielt, so müsste allmählich das Knochen-system ins Ungeheuerliche wachsen, eine Annahme, die mit den experimentellen Ergebnissen im Widerspruch steht.

Fernerentspricht die Versuchsanordnung, welche Curàtulo und Tarulli anwendeten, durchaus nicht den Anforderungen, die an einen exacten Stoffwechselversuch gestellt werden müssen. Bei dem geradezu paradox erscheinenden Ergebnisse, dass derartige gewaltige P_2O_5 -Mengen im Körper zurückbleiben sollen, wäre es unbedingt nöthig gewesen, neben der P_2O_5 -Ausscheidung im Harn auch die Ausscheidung im Koth zu berücksichtigen, sowie die Einfuhr in der Nahrung. Beides ist nicht geschehen; dies fällt um so mehr ins Gewicht, da in den Versuchen neben Fleisch grosse Mengen von Brot verfüttert wurden, ein Factor, der die Phosphorsäureausscheidung in beträchtlicher Weise beeinflussen konnte.

Um bei unseren Versuchen die Phosphorzufuhr nach Möglichkeit gleichmässig zu gestalten, wählten wir als Nahrung ausschliesslich Pferdefleisch und reines Schweineschmalz. Da

wir brauchbare Angaben über den Phosphorgehalt des Pferdefleisches nicht ausfindig machen konnten, wurde in einer grösseren Anzahl von Pferdefleischproben der Phosphorgehalt bestimmt.

Es ergab sich, wie ja auch zu erwarten war, dass derselbe nur ganz geringfügigen Schwankungen unterliegt. Zur Untersuchung wurden je 20 gr. frisches Pferdefleisch verwandt; dieselben wurden mit Soda-Salpeter geschmolzen; die Lösung der Schmelze wurde mit ammoniakalischer Magnesiamischung ausgefällt, die so ausgefallte Phosphorsäure unter den üblichen Cautelen als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen. Die aus je 20 gr. Pferdefleisch gewonnene Menge $Mg_2P_2O_7$ schwankte nur zwischen 0,143 gr. und 0,153 gr. Pferdefleisch enthält also constant 0,2% P.

Bei dem ersten Versuchsthier wurde der Phosphorgehalt des Kothes nicht bestimmt; derselbe enthielt, wie aus den Phosphorbestimmungen des Harns, sowie aus den Kothbestimmungen des zweiten Versuchsthier hervorgeht, so geringe Mengen, dass dieselben vernachlässigt werden konnten. Der Phosphorgehalt des Kothes bei Hund II wurde in derselben Weise wie im Pferdefleisch bestimmt. Der Harn wurde mit Urannitrat in der üblichen Weise titirt. Dass beide Versuchsthiere sich während der Beobachtungszeit im Stickstoffgleichgewicht befanden, wurde durch Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl kontrollirt.

Versuch I.

Hündin von 20,3 kgr. Gewicht. Tägliche Nahrung 500 gr. Pferdefleisch + 100 gr. Schweineschmalz = ca. 15 gr. N und ca. 2,4 gr. P_4O_5 .

A. Vorperiode vom 22. November bis 5. December = 13 Tage. Gewichtszunahme 1,2 kgr.

Zufuhr: 195 gr. N ca. und 31,2 gr. P_4O_5 ca.

Ausfuhr: 183 gr. N und 28,7 gr. P_4O_5 (nur im Harn bestimmt). Am 5. 12. Castration in Narkose; es wurde Heilung per primam erzielt.

B. I. Periode nach Castration vom 6. December bis 19. December = 13 Tage. Gewichtszunahme 1,6 kgr.

Zufuhr: 195 gr. N und 31,2 gr. P_4O_5

Ausfuhr: 191 gr. N und 27,9 gr. P_4O_5 (nur im Harn).

II. Periode nach Castration vom 26. Januar bis 6. Februar
= 11 Tage. Gewichtszunahme 1,3 kgr. Endgewicht des Thieres
25,6 kgr.

Zufuhr: 165 gr. N und 26,4 gr. P_2O_5

Ausfuhr: 173 gr. N und 27,8 gr. P_2O_5 .

Es wurden also ausgeschieden in der Vorperiode 2,2 gr. P_2O_5
pro die; in der ersten Periode nach der Castration 2,1 gr. P_2O_5 pro die;
in der zweiten Periode nach der Castration 2,5 gr. P_2O_5 pro die.

Versuch II.

Hündin von 7,8 Kilo Gewicht. Tägliche Nahrung = 350 gr.
Pferdefleisch + 25 gr. Schweineschmalz = ca. 10,5 gr. N und ca.
1,7 gr. P_2O_5 .

A. Vorperiode vom 16. Februar bis 24. Februar = 9 Tage. Gewichts-
constanz.

Zufuhr: 94,5 gr. N und 15,3 gr. P_2O_5

Ausfuhr: 100,5 gr. N und 15,3 gr. P_2O_5 { Harn 14,9 gr. P_2O_5
Koth 0,4 gr. P_2O_5 .

Am 24. Februar Castration; es wurde ebenfalls Heilung per primam
erzielt.

B. Periode nach der vom Castration 26. Februar bis 16. März
= 19 Tage. Gewichtsconstanz.

Zufuhr: 32,3 gr. P_2O_5 Ausfuhr: 30,3 gr. { Harn 29,4 gr. P_2O_5
Koth 1,4 gr. P_2O_5 .

Die N-Bilanz wurde nur vom 26. Februar bis 6. März gezogen,
während welcher Zeit das Thier im N-Gleichgewicht war.

Es wurden also ausgeschieden in der Vorperiode 1,7 gr. P_2O_5
pro die; in der Periode nach der Castration 1,6 gr. P_2O_5 pro die.

Beide Versuche stimmen darin völlig überein, dass
während der reichlich ausgedehnten Beobachtungszeit eine
Retention von Phosphor nicht stattgefunden hat.

Auch zeigte die Phosphorsäureausscheidung im Harn
nach der Castration keine derartige Veränderung, wie sie in
den Versuchen von Curàtulo und Tarulli zu Tage getreten ist.

Es haben also unsere Versuche ergeben, dass die An-
nahme, die von den italienischen Forschern beobachtete
Aenderung der Phosphorsäureausscheidung im Harn nach
Castration beruhe auf einer Retention von Phosphor im
Organismus, nicht stichhaltig begründet ist.

Eine Erklärung für die thatsächlich vorliegende Beobachtung, welche mit der unsrigen im Widerspruche steht, ist durch unsere Versuche nicht gegeben. Wir neigen zu der Ansicht, dass die von Curàtulo und Tarulli beobachtete constante Herabsetzung der Phosphorsäureausscheidung im Harn nach der Castration nicht auf dem Fortfall der Function der Ovarien beruht, sondern auf andern bisher nicht aufgeklärten Ursachen, von denen die Verfütterung grosser Mengen von Brot vielleicht am ersten in Betracht kommt.

Immerhin bleibt das von Curàtulo und Tarulli beobachtete Zusammentreffen der beiden Momente (Castration und herabgesetzte Phosphorsäureausscheidung) beachtenswerth.

Jena, 31. März 1899.

=====

Ueber Darstellung von Lecithin und anderen Myelinsubstanzen aus Gehirn- und Eigelbextracten.

Von

Dr. G. Zuelzer,

derz. Assistenten der med. Klinik Gießen.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Dr. Blum—Frankfurt a. M.)

(Der Redaction zugegangen am 4. April 1899.)

Es ist mir gelungen, im Aetherextract des Gehirns neue Myelinsubstanzen neben den bisher schon bekannten aufzufinden und mittelst eines einfachen Verfahrens, bei dem Zersetzungen ausgeschlossen scheinen, zu isoliren. Die ausführliche Beschreibung der Methode zur Darstellung des neuen Gehirnbestandtheils, sowie die Angaben einiger Eigenschaften des neuen Körpers, finden sich weiter unten gegeben; hier möchte ich nur ganz kurz das Wesentliche des Untersuchungsganges skizziren. Bisher haben alle Forscher bei der Bearbeitung des Aetherextractes des Gehirns dadurch unter ungünstigen und complicirten Versuchsbedingungen zu leiden gehabt, dass ihnen die Abscheidung des Cholesterins entweder nur unvollkommen oder doch nur mit bedeutenden Substanzverlusten durch vielfaches Umlösen gelang. Ich habe nun in dem Aceton ein einfaches Mittel gefunden, um von vornherein die Bestandtheile des Aetherextractes fast quantitativ in 2 Gruppen zu zerlegen: die cholesterinhaltige Aetheracetonlösung und den cholesterinfreien Niederschlag.

Versetzt man einen nicht allzu verdünnten Aetherextract von Gehirn mit Aceton, so fällt ein voluminöser weiss-gelber Niederschlag aus. Derselbe erweist sich als frei von Cholesterin, welches in der Aetheracetonlösung verbleibt, enthält aber

mehrere P-haltige Antheile. Die letzteren sind leicht dadurch von einander zu trennen, dass der eine von ihnen, das Protagon, in cholesterinfreiem Aether nicht mehr löslich ist. Der zweite, in reinem Aether lösliche Antheil lässt sich durch Versetzen mit Alkohol im Ueberschuss nochmals in zwei Theile scheiden: den in Lösung bleibenden, das Lecithin, und einen zweiten, der durch Alkohol gefällt wird. Letzterer Niederschlag, der N- und P-haltig ist, enthält den neu aufgefundenen Körper.

Da mir anfänglich die Bearbeitung des Gehirnextractes mit Aceton beträchtliche Schwierigkeiten bot, so studirte ich zunächst die Acetonfällung im Aetherextract des Eigelbs, in der Vermuthung, dort weniger complicirte Verhältnisse zu finden. Wenngleich hierbei sich nichts wesentlich Neues gezeigt hat, so bietet diese Behandlung des Eigelbs doch eine bequeme Methode zur Darstellung des Lecithins, so dass eine kurze Mittheilung derselben am Schlusse gerechtfertigt erscheint. Die Aufschliessung des Acetonniederschlages ergab für das Eigelb, dass derselbe sich aus Lecithin und Palmitin zusammensetzt. Beide Bestandtheile konnten durch Alkohol getrennt werden.

Im Einzelnen gestaltet sich die Gehirnuntersuchung folgendermassen: Das Hirn eines frisch geschlachteten Ochsen wird unmittelbar nach seiner Herausnahme, nachdem die Hirnhaut möglichst vollständig abgezogen ist, zerschnitten und in Aether suspendirt. Durch geeignete Unterlagen (Watte oder dergleichen) ist dafür zu sorgen, dass die Gehirnmasse nicht unmittelbar dem Boden des Gefässes aufliegt. Es bildet sich hierbei, wie schon Baumstark¹⁾ es beschreibt, eine untenliegende Blutschicht und ein darüber stehender, gelb gefärbter Aetherextract; beide werden abgegossen und im Scheidetrichter getrennt, und dieses Verfahren mit neuem Aether vielfach wiederholt. Die Aetherextraction wird so lange fortgesetzt, bis der zur Probe entnommene Aether beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterlässt.

Auf die weitere Behandlung des äthererschöpften Gehirns mit 80%igem Alkohol bei 45° C. soll hier nicht näher ein-

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. IX., S. 162 ff.

gegangen werden. Sie ist verschiedentlich ausführlich beschrieben worden,¹⁾ und sie liefert bekanntlich nur eine einzige Substanz, das Protagon. Die Eigenschaften des letzteren finden sich in der erwähnten Ruppel'schen Arbeit eingehend geschildert.

Die vereinigten, ziemlich klaren Aetherfiltrate werden entweder im Evacuationsapparat eingeengt oder in einer grossen Schale der Verdunstung an der Luft bei gewöhnlicher Temperatur überlassen. Es fällt hierbei ein fast schneeweisser, ziemlich massiger, feinflockiger Niederschlag aus. Derselbe ist P-haltig und erweist sich, wie schon Frémy und Baumstark²⁾ beobachteten, als identisch mit dem aus dem Alkoholextract darstellbaren Protagon. Eine Analyse dieses aus Alkohol von 45° umkrystallisirten Protagon's ergab folgendes Resultat:

C =	66,90%
H =	11,59%
N =	3,30%
P =	1,01%
S	—

Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung mit Bleichromat unter Vorlegung reducirter Kupferspiralen:

0,1710 gr. Substanz gaben 0,4195 gr. CO₂ = 66,9% C und 0,1785 gr. H₂O = 11,59% H.

Stickstoffbestimmung nach Dumas:

0,1810 gr. Substanz gaben bei 16° C. und 749 mm. Barometerstand 5,2 ccm. = 0,00597 gr. = 3,30% N.

Phosphorbestimmungen. (Sämmtliche Aschebestimmungen wurden nach der Methode von Carius im zugeschmolzenen Rohr ausgeführt.)

0,3442 gr. Substanz gaben 0,0124 gr. Mg₃P₂O₇.

Der Stickstoffgehalt dieses aus dem Aetherextract dargestellten Protagon's (3,30%) stimmt sehr gut mit dem N-Gehalt, den ich durch Analysen bei dem aus dem Alkoholextract gewonnenen Protagon ermittelte: N = 3,27% u. = 3,05%.

¹⁾ l. c. und Ruppel, Zeitschr. f. Biolog., N. F., 13, S. 96, woselbst die übrige Litteratur angegeben ist.

²⁾ l. c.

- I. 0,3190 gr. Substanz gaben bei 15° C. und 756 mm. Barometerstand
8,9 ccm. = 0,01036 gr. = 3,27% N.
II. 0,2780 gr. Substanz gaben bei 18° C. und 758 mm. Barometerstand
7,4 ccm. = 0,00847 gr. = 3,05%.

In der Litteratur zeigen nur die Kossel'schen Analysen¹⁾ des Protagonen einen mit meinen Resultaten übereinstimmenden Stickstoffgehalt (im Mittel 3,25%), während die anderen Autoren bedeutend niedrigere Werthe gefunden haben (Liebreich 2,80%, Gamgee und Blankenhorn 2,39%, Baumstark 2,35%, Ruppel 2,32%). Schwefel habe ich im Protagon nicht nachweisen können.

Nach dem Einengen des Aetherextractes und dem Abfiltriren von dem ausgefallenen Protagon wird die jetzt klare ätherische Lösung mit Aceton im Ueberschuss versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Der Niederschlag, welcher abfiltrirt und sorgfältig mit Aceton gewaschen wird, erweist sich als völlig frei von Cholesterin,²⁾ während die gesammte Masse des Cholesterins sich im Aceton-Aetherfiltrat in fast reinem Zustande befindet. Kocht man nämlich den durch Abdestilliren des Acetonäthers gewonnenen Rückstand mit Alkohol und filtrirt die heisse Flüssigkeit, so bleibt auf dem Filter meist nur eine ganz geringfügige Menge eines gelblichen Körpers (wahrscheinlich kleine, der Fällung mit Aceton entgangene Reste der später zu beschreibenden Myelinsubstanzen), während im erkaltenden Alkoholfiltrat reines Cholesterin vom Schmelzpunkt 145° auskrystallisirt. Auch Lecithin kann bei der Abscheidung mit Aceton nicht in grösserer Menge der Fällung entgangen sein, denn das Alkoholfiltrat liefert mit $PtCl_4$ kaum mehr als eine leichte Trübung.

Wir haben also in der Acetonfällung eine Methode, das Cholesterin auf eine ganz einfache, nicht eingreifende Art von den übrigen Bestandtheilen des Aetherextractes zu trennen.

Zur Weiterbehandlung des Acetonniederschlages, den ich hier den Uebersicht halber als Nd bezeichnen will, wird der-

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVII, S. 438.

2) Auflösen in $CHCl_3$, Ringprobe mit H_2SO_4 .

selbe, nach sorgfältigem Waschen mit Aceton, mit Aether aufgenommen, wobei ein Theil desselben ungelöst bleibt (Nd_u), der in Lösung gehende Antheil sei als Nd_l bezeichnet. Nach den Angaben früherer Autoren war es wahrscheinlich, dass der jetzt in Aether unlösliche Körper Protagon ist, welches vorher in dem stark eingeeengten Aetherextract noch durch Cholesterin in Lösung gehalten worden war. Er zeigte in der That alle Eigenschaften jenes Körpers und liess sich in Alkohol von 45° umkrystallisiren, um beim Erkalten in den bekannten rosettenförmig angeordneten Nadeln auszufallen. Da ausserdem die Analyse dieser aus Alkohol von 45° umkrystallisirten Substanz (Nd_u) einmal nach Dumas einen N-Gehalt von 3,25 % ergab, ein anderes Mal aber nach Kjeldahl aus 0,972 gr. Substanz 2,85 % N, scheint mir ihre Natur als Protagon sichergestellt.

Analyse nach Dumas:

0.1821 gr. Substanz gaben bei 29° C. und 753 mm Barometerstand 5.5 ccm. = 0,00592 gr. = 3,25 % N.

Falls überhaupt Lecithin selbständig im Gehirn vorkommt — und die Ansichten darüber sind in der Litteratur anscheinend sehr getheilt —, so müsste es sich in dem ätherlöslichen Theil (Nd_l) des Acetonniederschlages vorfinden, da, wie unsere Vorstudien am Aetherextract des Eigelbes ergeben hatten, Lecithin sich selbst aus fett- und cholesterinhaltigen Aetherlösungen leicht durch Aceton niederschlagen lässt. Der Nachweis reinen Lecithins hinwiederum stellte sein selbständiges isolirtes Vorkommen im Gehirn sicher; denn die bis jetzt mit der Gehirnmasse vorgenommenen chemischen Operationen — Lösen in Aether, Fällen mit Aceton — sind so indifferenter Natur, dass selbst die einfachste Spaltung dadurch ausgeschlossen erscheint. Zum Nachweis des Lecithins wurde der ätherlösliche Theil des Acetonniederschlages (Nd_l) mit Alkohol versetzt. Dabei entsteht eine starke Fällung Nd_{lu} ; die alkoholische Lösung sei mit Nd_{ll} bezeichnet. Letztere, in welcher das Lecithin zu suchen war, gab nun in der That mit Platinchlorid einen, aber nicht sehr reichlichen, Niederschlag. Derselbe

enthielt nach vollkommener Trocknung 10,7% Pt. Lecithin (als Dipalmityllecithin angenommen) verlangt einen Pt-Gehalt von 10,87%.

Die alkoholische Lösung gab ferner nach genügender Einengung einen Niederschlag mit Aceton (cf. unten Lecithindarstellung aus Eigelb) und nach dem Abdestilliren des Alkohols blieb eine zähe, wachsartige, knetbare Substanz von der Beschaffenheit des Lecithins zurück. Dieselbe war P-haltig: eine quantitative P-Analyse wurde nicht ausgeführt. Es dürfte somit das freie Vorkommen von Lecithin im Gehirn gesichert sein.

Der nunmehr zu besprechende recht reichliche Alkoholniederschlag des ätherlöslichen Theils des ersten Acetonniederschlages (Nd_{10}) — einem Ochsenhirn entsprechen meiner Schätzung nach etwa 3 gr. der trockenen Substanz — imponirte anfangs als ein einheitlicher Körper. Er schien, frisch gefällt, sich vollkommen wieder in Aether lösen zu können, um durch Alkohol oder Aceton von Neuem niedergeschlagen zu werden, und gab sehr gut übereinstimmende C-, H- und P-Analysenwerthe. Nur die in weiteren Grenzen (4—6%) schwankenden N-Werthe liessen an die Möglichkeit denken, dass 2 Körper von zwar ähnlichem C-, H- und P-, aber verschiedenem N-Gehalt in dem Niederschlag enthalten seien. Genauere Beobachtung lehrte dementsprechend alsbald, dass ein Theil schneller als der andere in Lösung ging, und dass sich bei öfterem Umlösen allmählich ein geringer Theil abtrennen liess, der für sich nicht mehr in Aether löslich war. Die Abscheidung bietet nicht unerhebliche Schwierigkeiten, da der feine Niederschlag das Filter leicht passirt und deshalb nur durch Decantiren abgesondert werden kann. Fraglos gelingt jedoch eine Reinigung mittelst öfteren Lösens in Aether und Fällens mit Alkohol oder Aceton. Auch hier dürfte, wie beim Protagon, eine Veränderung der Aetherlöslichkeit der einen Substanz durch die Gegenwart der anderen hervorgerufen sein. Lässt man die Alkohol- oder Acetonfällung längere Zeit mit Alkohol oder Aceton stehen oder filtrirt man den Niederschlag ab und lässt ihn lufttrocken werden, so ändert sich die Löslichkeit des Anfangsniederschlages in noch höherem Maasse, als eben beschrieben, der grössere Theil bleibt zwar nach wie vor löslich

und liefert den früheren gleichwertige Analysen; ein kleinerer Theil aber ist nicht mehr in Aether zu lösen, zumeist aber noch in Chloroform oder Benzol. Auf diese Weise aus einer Lösung mit Alkohol oder Aceton niedergeschlagen und zur Analyse gebracht, ergab der zweite Körper einen C-Gehalt von 55% und noch niedriger, also um ca. 5% geringer, als der ätherlösliche Antheil, hingegen einen N-Gehalt bis nahezu 11%.

Diese Substanz (b), die nach vollkommenem Trocknen auch in Benzol und Chloroform nicht mehr löslich ist, stellte die Verunreinigung des ätherlöslichen Theils a dar. Hier müssen neue Untersuchungen einsetzen, um, sei es durch fractionirte Fällung oder durch ein neues und andersartiges Fällungsmittel, eine sichere und vollkommene Trennung der Substanzen a und b herbeizuführen.

Der Körper a aber, der Hauptantheil des Alkoholniederschlags Nd_{10} , kann, wie ich annehmen möchte, selbst in reiner Form kaum nennenswerth andere Analysenwerthe ergeben, als die von mir gefundenen, und zwar sind die höchsten C- und die niedrigsten N-Werthe als die den richtigen am nächsten liegenden anzusehen. Es folgen die Analysen tabellarisch geordnet:

Körper	C	H	N	P
I	60,27	9,87	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 5,5 5,6 5,6 5,7 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 5px;"> } Dumas Kjeldahl </div>	2,98
II	60,26	9,82	4,04 Dumas 4,04 „ 3,80 Kjeldahl	2,61
III	60,04	9,53	4,2 Dumas 3,9 „	2,85
IV	59,37	9,36	6,2 Kjeldahl	2,52

Dreimal gelang es, den als b bezeichneten, also nach dem Trocknen in Aether nicht mehr löslichen Körper in genügender Menge zur Analyse zu gewinnen; leider reichte sie nicht mehr zur P-Bestimmung.

V ist von Körper IV durch Trocknen an der Luft abgetrennt, doch enthält IV, wie der hohe N- und der entsprechend niedrige C-Gehalt beweist, noch beträchtliche Mengen von b.

	C	H	N
V	55,52	8,74	10,97 (Kjeldahl)
VI	—	—	10,6 (Dumas)
VII	55,83	9,03	—

Nach diesen Analysenergebnissen erscheint mir die Annahme die grösste Berechtigung zu besitzen, dass dem in Aether leicht löslichen Antheil die Zusammensetzung

$$\begin{aligned}
 \text{C} &= 60,2\% \\
 \text{H} &= 9,8\% \\
 \text{N} &= 3,8\% \\
 \text{P} &= 2,6\% \\
 \text{O} &= 23,6\% \quad (\text{S} = 0)
 \end{aligned}$$

zukommt.

Es ist ja natürlich nicht ganz von der Hand zu weisen, dass der N-Gehalt noch etwas niedriger, der C- und H-Gehalt aber höher sein könnte; es spricht aber dagegen der Umstand, dass auch öfteres Umlösen der Substanz a keine geringeren Werthe ergab als ca. 4% N und 60% C; wie z. B. beim Präparat II, das 4 mal in Aether gelöst und abwechselnd mit Alkohol und Aceton ausgefällt wurde, während Präparat III nur 2 mal in dieser Weise behandelt wurde; und doch ergaben beide Präparate fast identische Analysenzahlen.

Die Annahme, dass Substanz VI etwa bei dem Trocknungsprocess aus a abgespalten wurde, besitzt keine Wahrscheinlichkeit, da mehrere Präparate noch nach Monaten dieselben Werthe bei der Analyse lieferten, wie bei der ursprünglichen Untersuchung, obwohl sie in der Zwischenzeit lange im Vacuum-Exsiccator verweilt hatten.

Ein Blick auf die Tabelle zeigt ein Schwanken des N-Gehalts der Myelinsubstanz a zwischen 4 und 6%, während der C- und H-Gehalt gut übereinstimmt und nur einmal um ca. 0,7 resp. 0,4% niedriger liegt, und zwar enthält dasjenige Präparat am wenigsten C und H, das sich andererseits als das N-reichste erwiesen hat. Das lässt sich wohl so erklären, dass der Substanz a jener zweite Körper b in wechselnden

Mengen noch angehaftet hat. Der C- und H-Gehalt dieser Beimengung liegt ja demjenigen der Hauptsubstanz so nahe, dass die Analyse durch geringe Beimischungen derselben kaum verändert werden kann; der N-Gehalt aber ist immerhin so verschieden, dass hier schon kleinere Mengen von b einen bemerkbaren Ausschlag zu geben vermögen. Nimmt man z. B. an, dass 1 Theil von b 10 Theilen a beigemischt ist — in Wirklichkeit dürfte die Verunreinigung wohl noch erheblich geringer sein —, so erhalten wir, wenn

$$\begin{array}{r} a = 60,26\% \text{ C, } 9,82\% \text{ H, } 3,8\% \text{ N, } 2,61\% \text{ P} \\ b = 55,52\% \text{ C, } 8,74\% \text{ H, } 10,97\% \text{ N, } 2,52\% \text{ P} \\ \hline 10a + b = 59,83\% \text{ C, } 9,72\% \text{ H, } 4,45\% \text{ N, } 2,60\% \text{ P;} \end{array}$$

selbst bei nur 5 Theilen a auf 1 Theil b erhielten wir noch

$$\begin{array}{l} \text{C} = 59,47\% \\ \text{N} = 4,995\% \end{array}$$

also Werthe, die nur bezüglich des N-Gehalts einer Correctur bedürfen; und zwar würden wir, wie schon erwähnt, den niedrigsten N-Gehalt als den richtigsten anzusehen haben.

Der oben analysirte Körper a (I – IV) stellt trocken eine weissliche Masse dar, die, vor Luft geschützt, lange Zeit ihre helle Farbe beibehält, dem Lichte ausgesetzt aber bald eine lehmgelbe Färbung annimmt. Ein Schmelzpunkt besteht nicht; bei 128° beginnt die Zersetzung der Substanz unter allmählicher Gasentwicklung. Der Körper löst sich in Aether, Benzol, Chloroform und wird durch Alkohol oder Aceton niedergeschlagen.

Erst eine Erschliessung der Constitution der nunmehr leicht zugänglich gemachten neuen Gehirnsubstanzen wird in Zukunft die richtige Classification und damit ihren Namen von selbst ergeben.

Anmerkung. Der oben beschriebene Körper gehört nach Thudichum's Eintheilung in die Gruppe seiner Kephaline und die Analyse desselben zeigt auch eine gewisse Aehnlichkeit mit der des Kephalins. Die Art seiner Darstellung ist principiell von der Thudichum's verschieden; doch ist hier nicht der Ort, auf diese bis in die letzte Zeit fortgeführte Streitfrage bezüglich der Thudichum'schen Darstellungsmethode einzugehen. Es sei nur Thudichum's Analyse des Kephalins mitgetheilt (cf. Thudichum, anatomische und klinische Chemie): C = 60%, H = 9,39%, N = 1,68%, P = 4,27%, O = 24,66%. Das Kephalin

besitzt demnach, verglichen mit obigem Körper, bei annähernd gleichem C- H- und O-Gehalt einen bedeutend geringeren N- und höheren P-Gehalt.

Die von Thudichum angeführten Eigenschaften des Kephalins, dass die ätherische Lösung über Nacht roth werde, beim Eindampfen sich bräune, dass sie grün fluorescire, dass das einige Zeit trocken aufbewahrte Kephalin eine dunkelschwarzgrüne Reflexfarbe annehme, alles dies war bei dem oben beschriebenen Körper nicht zu beobachten.

Nach obigen Ausführungen glaube ich mich zu dem Schlusse berechtigt, dass in dem Acetonniederschlag des Gehirn-ätherextractes neben dem bisher bekannten Protagon noch Lecithin und zwei neue Myelinsubstanzen enthalten sind.

Analysenbelege.

- I 0,4660 gr. Substanz ergaben
0,4169 > H_2O und 1,0296 gr. CO_2 , woraus
 $C = 60,27\%$, $H = 9,87\%$.
- II 0,4268 gr. Substanz ergaben
0,3755 > H_2O und 0,9430 gr. CO_2 , woraus
 $C = 60,26\%$, $H = 9,82\%$.
- III 0,2477 gr. Substanz ergaben
0,2125 > H_2O und 0,5453 gr. CO_2 , woraus
 $C = 60,04\%$, $H = 9,53\%$.
- IV 0,2545 gr. Substanz ergaben
0,2145 > H_2O und 0,5540 gr. CO_2 , woraus
 $C = 59,97\%$, $H = 9,36\%$.
- V 0,2230 gr. Substanz ergaben
0,1755 > H_2O und 0,4540 gr. CO_2 , woraus
 $C = 55,52\%$, $H = 8,74\%$.
- VII 0,3475 gr. Substanz ergaben
0,3072 > H_2O und 0,7072 gr. CO_2 , woraus
 $C = 55,83\%$, $H = 9,03\%$.

P-Bestimmungen.

- I 0,3566 gr. Substanz ergaben 0,0380 gr. $Mg_3P_2O_7$
 $P = 2,98\%$.
- II 0,4303 gr. Substanz ergaben 0,0402 gr. $M_2P_2O_7$
 $P = 2,61\%$.
- III 0,4554 gr. Substanz ergaben 0,0465 gr. $Mg_3P_2O_7$
 $P = 2,85\%$.
- IV 0,456 gr. Substanz ergaben 0,0410 gr. $Mg_3P_2O_7$
 $P = 2,52\%$.

N-Bestimmungen nach Dumas.

- Ia 0,4790 gr. Substanz gaben bei 769 mm. und 14°
22,2 ccm. = 0,02644 gr. = $5,5\%$ N.

- Ib 0,5895 gr. Substanz gaben bei 752 mm. und 17,5°
28,8 ccm. N = 0,0329 gr. = 5,6% N.
- Ic 0,4777 gr. Substanz gaben bei 769 mm und 19°.
23 ccm. N = 0,02676 gr. = 5,6% N.
- IIa 0,5492 gr. Substanz gaben bei 762 mm. und 19,5°
19,3 ccm. N = 0,02126 gr. = 4,04% N.
- IIb 0,5247 gr. Substanz gaben bei 740 mm. und 20°
19,1 ccm. N = 0,02126 gr. = 4,04% N.
- IIIa 0,5210 gr. Substanz gaben bei 728 mm. und 20,5°
20,0 ccm. N = 0,02186 gr. = 4,2% N.
- IIIb 0,5520 gr. Substanz gaben bei 741 mm. und 18°
19,2 ccm. N = 0,021619 gr. = 3,92% N.
- VI 0,2452 gr. Substanz gaben bei 754 mm. und 13°
22,2 ccm. N = 0,02602 gr. = 10,6% N.

Anmerkung. Nissl hatte gelegentlich eines Vortrages: Der gegenwärtige Stand der Nervenzellen-Anatomie und Pathologie (Centralbl. f. Nervenhk. u. Psychiatrie) darauf aufmerksam gemacht, dass, wenn man Gehirne in Alkohol härtet, in den Alkohol etwas übertritt, was denselben gelb färbt, und ausserdem offenbar Cholesterin. Diese Substanzen finden sich nach einiger Zeit in einem sich am Boden der Gefässe absetzenden Schlamm. Die Untersuchung solcher Massen, die theils von Herrn Dr. Nissl, theils von Herrn Prof. Grashey dem Laboratorium freundlichst zur Verfügung gestellt waren, hat ergeben, dass neben Cholesterin noch P- und N-haltige Bestandtheile vorhanden waren, die beim Ausfällen des Cholesterins ebenfalls aus ihrer Lösung ausfielen und mit den oben beschriebenen Myelinsubstanzen identisch sein dürften. Auch Protagon enthielt jener Niederschlag: C = 64,74%, H = 11,25%, N = 2,7%, P = 0,721%, offenbar durch die lange Dauer der Alkohol-einwirkung schon etwas zersetzt.

Aetherextract des Eigelbs.

Anhangsweise sei noch kurz die Lecithindarstellung aus Eigelb mittelst Acetonfällung des Aetherextractes mitgetheilt.

Das Eigelb von 50 Eiern wird in der Kälte mit Aether erschöpft. Die vereinigten Aetherfiltrate werden abdestillirt und vom Rückstand das darin enthaltene flüssige Oel bei Brutschranktemperatur abfiltrirt. Aufnehmen des möglichst ölfreien, eine zäh-schmierige, leicht schaumige, gelbe Masse bildenden Rückstandes mit wenig Aether und Fällern mit Aceton, solange als noch ein Niederschlag entsteht. Filtriren und Nachwaschen mit Aceton, bis das Waschaceton sich als cholesterinfrei erweist. Das Oel, sowie das gesammte im Eigelbextract enthaltene Cholesterin sind in Lösung geblieben und ins Filtrat übergegangen.

Wiederum Aufnehmen des Niederschlages in möglichst wenig Aether oder Benzol und Hinzufügen der mehrfachen Menge absoluten Alkohols. Es fällt aus der anscheinend schon reinen Lecithinlösung durch Alkohol nach kurzem bis mehrstündigem Stehen ein weisser amorpher Niederschlag aus. Nach dem Abfiltriren des letzteren kann nunmehr das reine Lecithin entweder durch erneute Acetonfällung¹⁾ oder durch Abdestilliren des Alkohol-Aethers und Trocknen im Vacuum erhalten werden.

Der erwähnte, durch Alkohol bewirkte Niederschlag stellt nach seiner Reinigung (Umkristallisiren aus heissem Alkohol, oder Lösen in Chloroform, Filtriren und Fällen mit Alkohol) ein krystallinisches weisses Pulver dar. Dasselbe ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in Chloroform, schwerer in Aether und wenig löslich in Alkohol oder Aceton. Sein Schmelzpunkt liegt bei 63°. Der Körper ist N-frei und enthält keine anorganischen Bestandtheile. Seine Analyse ergab

75,85% C, 12,44% H, 11,71% O.

0,1883 gr. Substanz gaben 0,2110 gr. H₂O und 0,5237 gr. CO₂.

Mit alkoholischer Kalilauge verseift, lässt sich, nach Ansäuern mit HCl, durch Aether eine saure Substanz ausschütteln. Nach Verdunsten des Aethers bleiben alsdann schuppenartige weisse Massen vom Schmelzpunkt 62° zurück, die dieselben Lösungsverhältnisse wie der ursprüngliche Körper zeigen. Letzterer ist demnach, wie leicht ersichtlich, Tripalmitin (berechnet C = 75,93%, H = 12,40%.)

Die Reinheit des auf oben beschriebene Weise dargestellten Lecithins wurde durch zahlreiche Phosphorbestimmungen sichergestellt, die stets einen P-Gehalt zwischen 3,7 und 4,1% ergaben; eine Platinbestimmung ergab 11,1% Pt.

¹⁾ Diese letzte Reinigung des schon nach den üblichen Methoden gereinigten Lecithins ist schon von Altmann empfohlen worden.

**Ueber die Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen,
über seine physiologische Rolle und über lösliche Kohlenhydrate,
die ihn begleiten.**

Zweite Abhandlung.

Von
E. Schulze.

(Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 6. April 1899.)

In einer in Verbindung mit S. Frankfurt unter obigem Titel in dieser Zeitschrift¹⁾ von mir publicirten Abhandlung wurden die Resultate mitgetheilt, die wir bei Untersuchung von ungefähr 30 pflanzlichen Objecten auf Rohrzucker erhielten. Diese Resultate lieferten im Verein mit früher schon bekannten Thatfachen den Beweis für die grosse Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen; sie konnten aber auch zur Aufklärung der physiologischen Rolle dienen, die dieser Zucker im pflanzlichen Stoffwechsel spielt. Ferner wurde von uns nachgewiesen, dass in den von uns untersuchten Objecten der Rohrzucker fast immer von löslichen invertirbaren Kohlenhydraten begleitet wurde, deren Quantität meistens bedeutend grösser war, als diejenige der genannten Zuckerart — eine Erfahrung, welche sowohl bei der qualitativen Prüfung auf Rohrzucker, als auch bei seiner quantitativen Bestimmung nicht unberücksichtigt bleiben darf.

Seit der Publication jener Abhandlung ist von mir und meinen Mitarbeitern noch eine Anzahl pflanzlicher Substanzen

¹⁾ Bd. XX, S. 511—555.

auf Rohrzucker untersucht worden. Die dabei erhaltenen Resultate, welche zur Ergänzung der früher gemachten Angaben und zur Bestätigung der aus letzteren abgeleiteten Schlussfolgerung dienen können, theile ich im Folgenden mit.

Für unsere Versuche, mit nur einer später zu erwähnenden Ausnahme, diente das auch früher von uns benutzte Verfahren; der Rohrzucker wurde aus den Extracten mit Hülfe von Strontianhydrat abgeschieden und sodann zur Krystallisation gebracht. Eine Beschreibung dieses Verfahrens haben wir zwar in der oben citirten Abhandlung schon gegeben; doch will ich im Folgenden noch einige Erfahrungen mittheilen, die bei der wiederholten Anwendung der Methode von uns gemacht worden sind.

Der rohrzuckerhaltige Niederschlag, welchen man erhält, wenn man den durch Auskochen des Untersuchungsobjectes mit 90—95%igem Weingeist gewonnenen Auszug mit kochender wässriger Strontianhydratlösung versetzt, und dann noch eine Zeit lang erhitzt, wird bei Ausführung unseres Verfahrens nach dem Abfiltriren, Auswaschen und Abpressen in eine Schale gebracht, mit heisser Strontianhydratlösung übergossen und eine viertel bis eine halbe Stunde lang gekocht; der dabei ungelöst gebliebene Theil des Niederschlags wird sodann durch Filtration mit Hülfe eines Heisswassertrichters von der braun gefärbten Lösung, aus welcher beim Erkalten Strontianhydrat auskrystallisirt, getrennt. Durch die beschriebenen Operationen zerlegt man also die im weingeistigen Extract durch den Strontianzusatz hervorgebrachte Fällung in zwei Theile, die ich im Folgenden der Kürze halber als «Strontianniederschlag» und «Strontianfiltrat» bezeichnen will. Der «Strontianniederschlag», welcher bei Ausführung der oben beschriebenen Operationen auf dem Filter bleibt, enthält den Rohrzucker, daneben aber in der Regel noch andere Kohlenhydrate, als Strontianverbindungen; das aus dem Heisswassertrichter ablaufende «Strontianfiltrat» schliesst wenig oder gar keinen Rohrzucker ein; es finden sich in ihm aber meistens andere Kohlenhydrate, bald in geringer, bald in grösserer Quantität. Man kann demgemäss das «Strontianfiltrat» unberücksichtigt lassen, wenn es sich nur um den Nachweis und die Isolirung des Rohrzuckers

handelt, wird es aber untersuchen, wenn man über die neben der genannten Zuckerart vorhandenen Kohlenhydrate sich möglichst weitgehenden Aufschluss verschaffen will. In diesem Falle befreit man die Flüssigkeit, nach Entfernung der beim Erkalten ausgeschiedenen Strontianhydratkrystalle, durch Einleiten von Kohlensäure so weit wie möglich vom gelösten Strontian, dunstet sie nach der Filtration im Wasserbade auf ein geringes Volumen ein und sucht sodann die darin enthaltenen Kohlenhydrate durch Ausfällung mit Alkohol zu gewinnen. Den auf diesem Wege aus dem « Strontianfiltrat » zur Abscheidung gebrachten Kohlenhydraten sind aber in der Regel noch andere Substanzen in nicht unbeträchtlicher Quantität beigemengt und es bedarf wiederholter Ausfällung durch Alkohol sowie anderer, später noch zu beschreibender Reinigungsoperationen, um sie in reinere Produkte überzuführen.

Ueber die Art und Weise, in welcher man aus dem « Strontianniederschlag » den Rohrzucker und die neben letzterem sich vorfindenden Kohlenhydrate isoliren kann, ist zur Ergänzung der in der ersten Abhandlung gemachten Angaben noch Folgendes mitzutheilen: der in Wasser vertheilte Niederschlag wird mit Kohlensäure behandelt,¹⁾ die durch Filtration vom Strontiumcarbonat getrennte Lösung sodann im Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Den Syrup extrahirt man wiederholt mit kochendem 95%igen Weingeist. Die vereinigten weingeistigen Extracte, welche den grössten Theil des Rohrzuckers enthalten, werden eingedunstet, der Verdampfungsrückstand wieder mit kochendem Weingeist behandelt. Die nach dem Erkalten vom Ungelösten abgegossene weingeistige Lösung liefert, falls sie schon rein genug ist, beim langsamen Verdunsten²⁾ bald Rohrzuckerkrystalle; andernfalls dunstet man sie wieder ein, behandelt den Verdampfungsrückstand wieder mit kochendem Weingeist und wiederholt diese Operationen, unter stetiger Beseitigung der in Weingeist unlöslichen oder schwer löslichen Substanzen,

1) Man vergleiche unsere erste Abhandlung, S. 514.

2) Zu diesem Zweck brachten wir sie unter eine Glasglocke über concentrirte Schwefelsäure.

noch mehrmals. So gelingt es in der Regel auch dann, wenn nur relativ geringe Rohrzuckermengen vorhanden sind, schliesslich weingeistige Lösungen zu gewinnen, welche beim Verdunsten Rohrzuckerkrystalle liefern. Zur Beförderung der Krystallausscheidung kann man den Lösungen während des Verdunstens von Zeit zu Zeit etwas starken Weingeist zusetzen; doch darf dieser Zusatz, wie sich von selbst versteht, nicht in solchem Maasse geschehen, dass in der Flüssigkeit eine nicht wieder verschwindende Trübung entsteht.

Die in kochendem Weingeist schwer löslichen oder unlöslichen syrupösen Rückstände, welche bei Ausführung der im Vorigen beschriebenen Operationen nach dem Abgiessen der weingeistigen Extracte übrig bleiben, schliessen in der Regel noch einen Theil des Rohrzuckers ein. Man kann letzteren noch in Krystallen gewinnen, indem man den syrupösen Rückstand in wenig Wasser löst, die Lösung unter beständigem Umrühren in absoluten Alkohol giesst, die dadurch erzeugte Fällung abfiltrirt und das Filtrat langsam verdunsten lässt.

Es liegt auf der Hand, dass man einer solchen Reinigungsoperation auch die bei Verarbeitung des «Strontianniederschlags» resultirende zuckerhaltige Lösung direkt unterwerfen kann; man giesst in solchem Falle diese Lösung, nachdem sie durch Eindunsten genügend concentrirt worden ist, unter beständigem Umrühren in absoluten Alkohol, beseitigt die dabei niederfallenden Kohlenhydrate durch Filtration, verdunstet das Filtrat im Wasserbade zum Syrup und extrahirt letzteren mit kochendem Weingeist; die dabei gewonnene zuckerhaltige Lösung wird dann so behandelt, wie oben angegeben worden ist. Dass es von Vortheil sein kann, die zuckerhaltigen Flüssigkeiten mit Thierkohle zu behandeln, ehe man sie weiter verarbeitet, braucht kaum gesagt zu werden.

Ob mit Hülfe der von mir beschriebenen Operationen der Rohrzucker leichter oder weniger leicht in Krystallform sich gewinnen lässt, das hängt vorzugsweise ab von der Beschaffenheit der den Rohrzucker begleitenden Kohlenhydrate, sowie von der Quantität, in der sie sich vorfinden. Sind diese Kohlenhydrate wenig löslich in kochendem 95^o/oigen Weingeist und

ist ihre Menge nur gering, so gelingt es in der Regel sehr rasch, den Rohrzucker in Form gut ausgebildeter Krystalle zu isoliren. Anders ist es, wenn der Rohrzucker nur in relativ geringer Menge sich vorfindet und wenn die ihn begleitenden Substanzen eine etwas grössere Löslichkeit in kochendem Weingeist besitzen; dann bedarf es oft wiederholten Eindunstens der Lösung und Wiederausziehens mit kochendem Weingeist, um den Rohrzucker krystallisationsfähig zu machen. Es sei z. B. erwähnt, dass aus einigen der weiter unten genannten Objecte, nämlich aus den Samen von *Pinus Cembra* und *Phaseolus multiflorus*, aus den Cotyledonen der Keimpflanzen dieser *Phaseolus*-Art und aus der Spindel des Maiskorns der Rohrzucker nach dem von mir beschriebenen Verfahren sehr leicht in Krystallen zu gewinnen war, während die Erreichung dieses Zieles z. B. bei den Haferpflanzen weit grössere Mühe verursachte; hier musste die bei Verarbeitung des «Strontian-niederschlags» erhaltene Rohrzuckerlösung mit Hülfe der von mir angegebenen Mittel wiederholt gereinigt werden, ehe sie Krystalle lieferte.

Die Nebenbestandtheile üben also in manchen Fällen einen weitgehenden Einfluss auf die Krystallisation des Rohrzuckers aus den in beschriebener Weise erhaltenen Lösungen aus. Da nun auch die Beschaffenheit dieser Nebenbestandtheile nicht immer die gleiche ist, so lässt sich keine für alle Fälle genau zutreffende Vorschrift für die Art und Weise geben, in welcher man die bei Verarbeitung der «Strontianniederschläge» resultirenden Flüssigkeiten behufs der Gewinnung von Rohrzuckerkrystallen zu behandeln hat; denn die Eigenschaften der Nebenbestandtheile machen es zuweilen erforderlich, die Behandlungsweise in einzelnen Punkten zu modificiren. Auf diesen Umstand haben wir schon in der ersten Abhandlung aufmerksam gemacht.

Die Kohlenhydrate, die sich in dem bei Ausführung unseres Verfahrens erhaltenen Syrup neben Rohrzucker noch vorfinden, bleiben grösstentheils zurück, wenn man diesen Syrup behufs Gewinnung des Zuckers wiederholt mit kochendem Weingeist behandelt; sie können aus der concentrirten wässerigen Lösung

des Rückstands durch Weingeist gefällt werden. Doch haben wir diese wässerige Lösung vor der Ausfällung der Kohlenhydrate stets gewissen Reinigungsoperationen unterworfen. So wurde zur Entfernung einer meistens darin noch enthaltenen geringen Strontianmenge etwas Ammoniumcarbonat zugesetzt. Auch wurde die Lösung zur Entfärbung mit Thierkohle behandelt. Endlich haben wir in einigen Fällen die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure versetzt und den durch dieses Reagens hervorgerufenen Niederschlag abfiltrirt. Aus dem Filtrat wurde die überschüssige Phosphorwolframsäure durch Zusatz von Barytwasser entfernt.¹⁾ Die durch solche Operationen gereinigte Lösung wurde sodann durch Eindunsten im Wasserbade auf eine geeignete Concentration gebracht und nun unter beständigem Umrühren nach und nach, am besten tropfenweise, in absoluten Alkohol gegossen. Besass die wässerige Lösung die richtige Concentration, so werden die Kohlenhydrate durch den Alkohol in feiner Vertheilung, meistens als flockige Niederschläge, ausgeschieden; war die Lösung zu concentrirt, so scheiden sich beim Eingiessen in den Alkohol syrupöse Tropfen aus; bei zu grosser Verdünnung der Lösungen werden die Kohlenhydrate zwar durch den Alkohol in der Regel flockig gefällt, ballen sich aber bald zu klebrigen, am Boden und an den Wänden des Gefässes anhaftenden Massen zusammen. Es ist daher zweckmässig, stets einen Vorversuch mit einem Theil der Lösung zu machen und ihre Concentration zu ändern, falls letztere für die Ausfällung der Kohlenhydrate nicht die geeignete ist. Die so gewonnenen Produkte werden durch mehrmaliges Wiederauflösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol gereinigt.²⁾ Diese Reinigung ist nöthig, um sie

1) Einen Barytüberschuss kann man durch Einleiten von Kohlensäure oder durch Zusatz von Ammoniumcarbonat entfernen.

2) Zuweilen scheiden sich die Kohlenhydrate, beim Eingiessen ihrer wässerigen Lösung in den Alkohol, in so feiner Vertheilung aus, dass sie sich nicht absetzen und auch nicht gut abzufiltriren sind. Ein Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Natronlauge bewirkt dann, dass die gefällte Substanz sich gut absetzt.

sowohl von anderen Beimengungen, als auch von Rohrzucker zu befreien. Denn es liegt auf der Hand, dass es in der Regel nicht gelingen wird, den bei Verarbeitung des «Strontianniederschlags» erhaltenen Syrup durch Auskochen mit Weingeist vollständig vom Rohrzucker zu befreien; ist aber der Rückstand zuckerhaltig, so wird auch in die in seiner wässerigen Lösung durch Alkohol hervorgebrachte Fällung meistens etwas Zucker eingehen, und es wird wiederholter Ausfällung aus wässriger Lösung bedürfen, um diesen Zucker zu entfernen.

Nicht in allen Fällen aber wird man auf diesem Wege, auch bei sehr häufiger Wiederholung der Ausfällung, chemisch einfache Substanzen erhalten; zudem liegt ein Uebelstand darin, dass die Entscheidung der Frage, ob die gewonnenen Produkte einheitlich sind oder nicht, zuweilen mit Schwierigkeiten verbunden ist. Am günstigsten ist die Sachlage, falls die bezügliche Substanz sich in Krystallform überführen lässt (was uns aber nur selten gelungen ist); liegt ein amorphes Produkt vor, so wird man dasselbe, nachdem es auf seine Eigenschaften, insbesondere auf sein spezifisches Drehungsvermögen, untersucht worden ist, einer wiederholten Ausfällung durch Weingeist aus wässriger Lösung unterwerfen und dann wieder untersuchen; haben durch die Wiederholung der Ausfällung seine Eigenschaften keine Aenderung erlitten, so ist es wahrscheinlich, wenn auch nicht völlig sicher, dass ein chemisch einfacher Körper vorliegt.

Die im Vorigen erwähnten Umstände, sowie die Schwierigkeiten, welche in denjenigen Fällen, in welchen Gemenge vorliegen, einer Trennung der Gemengtheile entgegenstehen, haben zur Folge, dass die Untersuchung der ausser Rohrzucker aus den «Strontianniederschlägen» abgeschiedenen Kohlenhydrate häufig zu unbefriedigenden Resultaten führt. Dies bewog uns, eine genauere Untersuchung dieser Stoffe nur in einer beschränkten Anzahl von Fällen vorzunehmen.

Das im Vorigen Gesagte gilt auch für die Kohlenhydrate, die aus den «Strontianfiltraten» durch Ausfällung mittelst

Weingeist sich abscheiden lassen.¹⁾ Es liegt auf der Hand, dass bei Verarbeitung dieser Flüssigkeiten der Gewinnung reiner, chemisch einfacher Substanzen ebenso grosse, zuweilen vielleicht noch grössere Schwierigkeiten entgegenstehen, als bei der Verarbeitung der « Strontianniederschläge ». Die Mittel, deren wir uns zur Reinigung der gewonnenen Produkte bedienten, waren in beiden Fällen die gleichen.

Die Objecte, die wir nach dem Abschlusse der von Frankfurt und mir publicirten Abhandlung noch auf Rohrzucker untersuchten, waren Pflanzensamen, etiolirte Keimpflanzen und oberirdische Theile grüner Pflanzen. Die grosse Verbreitung des Rohrzuckers in reifen Pflanzensamen ist von uns schon nachgewiesen worden; da aber die früher untersuchten Samen hauptsächlich von Leguminosen und Gramineen stammten, so schien es von Interesse, auch noch die Samen einer im System jenen Gewächsen fernstehenden Pflanzengruppe auf die genannte Zuckerart zu untersuchen; wir wählten dazu die Coniferensamen. Doch haben wir auch noch den Samen einer Leguminose, nämlich *Phaseolus multiflorus*, untersucht. Dies geschah, um diesen Samen hinsichtlich des Rohrzuckergehaltes mit den Keimpflanzen der gleichen Leguminosenart vergleichen zu können. Die Untersuchung einiger Gramineenpflanzen hatte neben der Prüfung auf Rohrzucker den Zweck, über die neben dieser Zuckerart im Saft enthaltenen Kohlenhydrate Aufschluss zu gewinnen.

Der mit Hülfe von Strontianhydrat aus den Extracten abgeschiedene Rohrzucker wurde stets durch Umkrystallisiren aus verdünntem Weingeist gereinigt.²⁾ Zu seiner Identificirung dienten, ebenso wie früher, neben dem Aussehen und dem

¹⁾ Wir haben diese Kohlenhydrate bis jetzt nur wenig untersucht; in der Beschaffenheit scheinen sie in der Regel mit den in der gleichen Weise aus den zugehörigen Strontianniederschlägen gewonnenen Kohlenhydraten übereinzustimmen.

²⁾ Vor dem Umkrystallisiren besass der Zucker in manchen Fällen ein Aussehen, das von dem gewöhnlichen Aussehen der Rohrzuckerkrystalle bedeutend abwich.

süssen Geschmack der Krystalle, sein specifisches Drehungsvermögen¹⁾ in wässriger Lösung sowie die folgenden Reactionen:

a) Die Krystalle gaben beim Erhitzen mit Resorcin und Salzsäure eine roth gefärbte Flüssigkeit, aus welcher sich beim Erkalten braune Flocken ausschieden (sogenannte Lävulose-Reaction).

b) Die wässrige Lösung der Krystalle reducirte nach dem Erhitzen mit Salzsäure die Fehling'sche Lösung, während sie, nicht mit Salzsäure erhitzt, kein Reduktionsvermögen besass.

c) Nach dem Erwärmen mit Invertin²⁾ auf ca. 40° reducirte die wässrige Lösung der Krystalle die Fehling'sche Flüssigkeit.

Dass es sehr leicht ist, den Rohrzucker mit Sicherheit zu erkennen, sobald er in Krystallen vorliegt, ist schon in unserer ersten Abhandlung ausgesprochen worden und darf auch als allgemein bekannt gelten.

Die Kohlenhydrate, die wir ausser Rohrzucker aus den Extracten abscheiden konnten, sind von uns nicht analysirt worden; dass es aber wirklich Kohlenhydrate waren, darf aus ihren Eigenschaften geschlossen werden. Sie waren sehr leicht löslich in Wasser und wurden aus der Lösung durch Weingeist gefällt; durch wiederholte Fällung gereinigt und hierauf im Exsiccator getrocknet, bildeten sie weisse zerreibliche Massen, welche geschmacklos waren oder schwach süsslich schmeckten, beim Erhitzen im Platinschälchen unter starkem Aufblähen verkohlten und dabei den Geruch entwickelten, der den

1) Zur Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens der Rohrzuckerpräparate und der anderen von uns untersuchten Kohlenhydrate diente ein Soleil-Ventzke'scher Polarisationsapparat. Die Angaben, die wir über die Ergebnisse der Bestimmungen im Folgenden machen, gründen sich in jedem Falle auf die Mittel von mehreren Ablesungen. Die Bestimmungen wurden sämmtlich bei Zimmertemperatur ausgeführt. Für reinen Rohrzucker ist $[\alpha]_D$ bekanntlich = $+ 66,5^\circ$.

2) Zur Verwendung kam ein von Merck in Darmstadt bezogenes Invertinpräparat. Vor der Behandlung mit Invertin wurde den Rohrzuckerlösungen ein wenig Thymol zugesetzt.

verbrennenden Kohlenhydraten eigenthümlich ist. Mit Resorcin und Salzsäure gaben sie sämmtlich die sogenannte Lävulose-reaction (es entstand eine rothe Lösung, die sich beim Erkalten unter Abscheidung brauner Flocken trübte). Ihre wässrige Lösung reducirte nicht die Fehling'sche Flüssigkeit; nach dem Erhitzen mit verdünnter Salzsäure besaßen sie aber starkes Reductionsvermögen. Ihre wässrigen Lösungen zeigten im Polarisationsapparat optische Wirksamkeit. Zieht man nun ferner in Betracht, dass diese Substanzen schwer lösliche, durch Kohlensäure zersetzbare Strontianverbindungen gaben, so kann man kaum daran zweifeln, dass es Kohlenhydrate waren.

Im Folgenden gehe ich zur Mittheilung der Resultate über, welche für die verschiedenen Objecte sich ergaben. Bei der Bestimmung des Drehungsvermögens des Rohrzuckers und der anderen Kohlenhydrate wirkte Dr. E. Winterstein mit.

A. Samen von *Pinus Cembra*, *Pinus maritima* und *Picea excelsa*.

Die zerkleinerten Samen wurden mit Hülfe von Aether oder Petroläther ziemlich vollständig entfettet und sodann mit Weingeist von 90—92 Volumprocent ausgekocht. Aus den Extracten liess sich auf dem oben beschriebenen Wege Rohrzucker gewinnen.¹⁾ Besonders leicht gelang die Abscheidung des Zuckers bei den Samen von *Pinus Cembra* (Arve oder Zirbelkiefer), weniger leicht bei den Samen von *Pinus maritima* (Seekiefer) und von *Picea excelsa* (Fichte). Die Ausbeute war in allen Fällen nur gering, am grössten bei *Pinus Cembra*. Die Zuckerkrystalle gaben die oben angegebenen Reactionen; die Untersuchung im Polarisationsapparat, für welche selbstverständlich die reinsten Präparate verwendet wurden, gab folgende Resultate:

¹⁾ Ueber das Vorkommen von Rohrzucker in den Samen von *Picea excelsa* ist von N. Rongger, der diese Samen in meinem Laboratorium untersuchte, schon in den „Landwirthschaftlichen Versuchstationen“, Bd. 51, S. 81 eine Mittheilung gemacht worden; ebendasselbst auf S. 191 findet sich eine Mittheilung von N. Rongger und mir über das Vorkommen von Rohrzucker in den Samen von *Pinus Cembra*.

Rohrzucker aus *Pinus Cembra*:

Eine Lösung, welche in 20 ccm. 1,2 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr 23° S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 66,3^\circ$.

Rohrzucker aus *Pinus maritima*:

Eine Lösung, welche in 10 ccm. 0,261 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr 10,2° S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 67,6^\circ$.

Rohrzucker aus *Picea excelsa*:

Eine Lösung, welche in 10 ccm. 0,4292 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr 16,5° S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 66,5^\circ$.

Die im weingeistigen Extract aus den Samen von *Picea excelsa* durch Strontianhydrat hervorgebrachte Fällung enthielt neben Rohrzucker noch ein zweites Kohlenhydrat, welches in starkem Weingeist fast unlöslich war und sich in der oben beschriebenen Weise vom Rohrzucker trennen liess.¹⁾ Durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit absolutem Alkohol gereinigt und sodann im Exsiccator getrocknet, bildete es eine reinweisse, in Wasser sehr leicht lösliche Masse, welche erst nach dem Erhitzen mit Salzsäure die Fehling'sche Lösung reducirte. Seine wässrige Lösung war stark rechtsdrehend $[\alpha]_D = + 105,4^\circ$. Beim Erhitzen mit Salpetersäure lieferte es Schleimsäure; die Ausbeute daran, bestimmt nach der von Tollens gegebenen Vorschrift, betrug 29,2%. Obwohl dieses Kohlenhydrat im Drehungsvermögen der Melitose (Raffinose) sehr nahe steht, kann es doch nicht für identisch mit letzterer erklärt werden; denn es gelang nicht, dasselbe in Krystallform überzuführen; auch lieferte es mehr Schleimsäure, als das eben genannte Polysaccharid.

Aus den Samen von *Pinus maritima* wurde eine ähnliche Substanz gewonnen, welche in der gleichen Weise sich vom

¹⁾ Ueber dieses Kohlenhydrat finden sich auch Angaben in der oben citirten Abhandlung N. Rongger's.

Rohrzucker trennen liess und beim Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure gleichfalls Schleimsäure lieferte.

Auch die Samen von *Pinus Cembra* scheinen neben Rohrzucker noch ein anderes lösliches, durch Strontianhydrat fällbares, Kohlenhydrat zu enthalten. Aus demselben liess sich aber keine Schleimsäure gewinnen.

B. Samen von *Phaseolus multiflorus*.

Aus diesen Samen liess sich mit Hülfe des oben beschriebenen Verfahrens leicht Rohrzucker gewinnen, und zwar lieferten 750 gr. lufttrockener Samen (= 580 gr. Trockensubstanz exclusive Schalen) ungefähr 2,7 gr. Zuckerkrystalle. Diese Krystalle gaben die oben angegebenen Reactionen; die Untersuchung im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, welche in 20 ccm. 1,704 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $33,0^{\circ}$ S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 67,0^{\circ}$.

Ein nur einmal aus Weingeist umkrystallisiertes Zuckerpräparat zeigte ein etwas stärkeres Drehungsvermögen $[\alpha]_D = + 68,3^{\circ}$.

Wie in anderen Leguminosensamen, so fand sich auch hier noch ein nicht in Krystallform überführbares Kohlenhydrat vor, welches in starkem Weingeist weniger löslich war, als Rohrzucker. Dasselbe reducirte die Fehling'sche Lösung erst nach dem Erhitzen mit Salzsäure, gab mit Resorcin und Salzsäure die sogenannte Lävulosereaction und lieferte beim Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure eine ansehnliche Quantität von Schleimsäure (mehr als 25%). Seine wässrige Lösung war stark rechtsdrehend; $[\alpha]_D$ wurde $= + 110^{\circ}$ gefunden.¹⁾ Wir haben diese Substanz nicht durch wiederholtes Ausfällen mit Weingeist aus wässriger Lösung in ganz reinen Zustand überzuführen gesucht und vermögen daher auch nicht anzugeben, ob sie mit den in anderen Leguminosensamen

¹⁾ Die Zahl bezieht sich auf das im Exsiccator getrocknete, aber noch nicht wasserfreie Produkt.

gefundenen Kohlenhydraten ähnlicher Beschaffenheit identisch ist oder nicht.

C. Cotyledonen der Keimpflanzen von *Phaseolus multiflorus*.

In den Cotyledonen keimender Samen von *Phaseolus multiflorus* vermochte J. Sachs keine Glucose nachzuweisen,¹⁾ obwohl doch nicht bezweifelt werden kann, dass während der Keimung das Stärkemehl der Cotyledonen in lösliche Produkte umgewandelt wurde und dass diese Produkte den wachsenden Theilen der Keimlinge zuflossen. Die Vermuthung, dass hier als gelöstes Kohlenhydrat Rohrzucker sich vorfinde, veranlasste mich, die Cotyledonen von *Phaseolus*keimpflanzen, welche bei schwachem Lichtzutritt 7—8 Tage lang vegetirt hatten, zu untersuchen. Es gelang sehr leicht, aus diesen Cotyledonen nach unserem Verfahren Rohrzucker in Krystallen zu gewinnen. Die Ausbeute war eine relativ grosse; aus ca. 650 gr. frischer Cotyledonen = ca. 166 gr. Trockensubstanz (ohne Schalen) erhielt ich 2,8 gr. Rohrzuckerkrystalle. Diese Krystalle gaben die oben angegebenen Reactionen; die Untersuchung im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine wässerige Lösung, welche in 20 ccm. 1,671 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $32,1^{\circ}$ S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +66,4^{\circ}$.

Ein nur einmal aus verdünntem Weingeist umkrystallisiertes Präparat zeigte ein etwas grösseres Drehungsvermögen ($[\alpha]_D = +69,4^{\circ}$).

Die Ausbeute an Rohrzucker aus den Cotyledonen der Keimpflanzen war mehr als dreimal so gross, wie diejenige, welche ich aus den ungekeimten *Phaseolus*samen erhielt. Da es nun ferner wahrscheinlich ist, dass in den Samen der Rohrzucker grösstentheils nicht in den Cotyledonen, sondern im Blatt- und Wurzelkeim sich vorfand, so ergibt sich die Schlussfolgerung, dass in den Cotyledonen während des Keimungsvorgangs Rohrzucker sich gebildet hatte — ein Vorgang, der von mir früher schon für andere Leguminosensamen

¹⁾ Schon erwähnt in unserer ersten Abhandlung, woselbst auch ein Citat sich findet.

nachgewiesen worden ist. Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, dass der Rohrzucker aus den Cotyledonen den wachsenden Theilen der Keimpflanzen zugeführt wurde; er dient also in den Cotyledonen als «Entleerungsstoff».

Während aus den ungekeimten Phaseolussamen ausser Rohrzucker noch ein Kohlenhydrat, welches bei der Oxydation Schleimsäure lieferte, zur Abscheidung gebracht werden konnte, gelang dies nicht bei den Cotyledonen der Keimpflanzen. Zwar gab der Rückstand, welcher bei Behandlung des zuckerhaltigen Syrups mit kochendem Weingeist übrig blieb, eine Fällung, als man ihn mit etwas Wasser verdünnte und die Flüssigkeit sodann in absoluten Alkohol goss; aber die so gefällte Substanz gab beim Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure keine Schleimsäure. Das schleimsäureliefernde Kohlenhydrat, das in den ungekeimten Samen sich vorfand, war demnach während der Keimung umgewandelt worden. Für diese Schlussfolgerung liess sich leicht noch eine weitere Stütze gewinnen. Wenn man die von den Schalen befreiten Phaseolussamen zerkleinert und mit kaltem oder schwach erwärmtem Wasser extrahirt, den Auszug zur Entfernung von Eiweisssubstanzen etc. mit Bleiessig versetzt, das Filtrat vom Bleiniederschlag, nachdem es durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit ist, zum Syrup eindunstet, diesen Syrup in Salpetersäure vom specifischen Gewicht 1,15 auflöst und diese Lösung auf ein geringes Volumen eindunstet, so erhält man Schleimsäure (schon bei Anwendung von 20—25 gr. Samenpulver resultirt eine nicht unbeträchtliche Schleimsäuremenge). In der gleichen Weise vermochte ich dagegen aus den Cotyledonen der Keimpflanzen, bei Anwendung von ca. 27 gr. Trockensubstanz, keine Schleimsäure zu erhalten.

Das in den Phaseolussamen enthaltene Kohlenhydrat, welches bei der Oxydation Schleimsäure lieferte, war also während des Keimungsvorganges entweder vollständig oder bis auf einen nicht mehr nachweisbaren Rest verbraucht worden.¹⁾ Das Gleiche gilt, wie früher von uns nachgewiesen

¹⁾ Eine Schlussfolgerung, gegen welche sich nur dann ein Einwand erheben liesse, wenn man die unwahrscheinliche Annahme machen

worden ist, für die in den Samen von *Lupinus* enthaltene Lupeose (früher als β -Galactan bezeichnet), sowie für ein ähnliches Kohlenhydrat, das sich in den Samen von *Vicia sativa* vorfindet.

Was für Produkte während des Keimungsvorganges aus diesen Kohlenhydraten entstehen, darüber lässt sich auf Grund der bis jetzt vorliegenden Beobachtungen etwas Bestimmtes nicht aussagen; doch darf es wohl für nicht unwahrscheinlich erklärt werden, dass sie in den keimenden Samen zur Bildung von Rohrzucker verwendet werden.

D. Endosperm der Keimpflanzen von *Ricinus communis*.

Die Abscheidung von Rohrzucker aus diesem Object geschah nicht mit Hülfe des oben beschriebenen Verfahrens, sondern auf ganz anderem Wege. Von jungen, bei schwachem Lichtzutritt gezogenen Keimpflanzen von *Ricinus communis*, bei denen das hypocotyle Glied sich noch nicht gestreckt hatte, wurde das Endosperm abgetrennt und in absoluten Alkohol gebracht in der Absicht, es später auf seine stickstoffhaltigen Bestandtheile zu untersuchen. Als dem Alkohol später noch Aether zugesetzt worden war, schieden sich nach einiger Zeit an der Gefässwand kleine, gut ausgebildete Krystalle ab, welche süß schmeckten und die oben angegebenen Reactionen des Rohrzuckers gaben. Da ihre Quantität nur gering und eine Bestimmung ihres specifischen Drehungsvermögens im Polarisationsapparat daher nicht mit Sicherheit ausführbar war, so untersuchte auf meine Bitte mein College, Herr Professor U. Grubenmann, dieselben krystallographisch; auf Grund dieser Untersuchung erklärte er die Krystalle für Rohrzucker.

Man wird vielleicht annehmen dürfen, dass bei der Umwandlung des im Endosperm von *Ricinus* in grosser Menge enthaltenen Fettes während der Keimung Rohrzucker sich bildet und dass diese Zuckerart also auch hier die Rolle eines Entleerungsstoffes spielt.

wollte, dass jenes Kohlenhydrat sich nur im Blatt- und Wurzelkeim vorgefunden hätte.

E. Kolben von Zea Mais.

Wie in den Samen anderer Cerealien, so findet auch in demjenigen von Zea Mais bekanntlich während des Reifens starke Anhäufung von Stärkemehl statt. Es ist nicht zu bezweifeln, dass als Material für die Stärkemehlbildung die aus den grünen Pflanzentheilen in die Samen einwandernden Kohlenhydrate dienen. Gesetzt, dass unter diesen Kohlenhydraten Rohrzucker sich findet oder dass letzterer allein hier als «Wanderstoff» auftritt, so muss in demjenigen Theile des Maiskolbens, den man als die Spindel bezeichnet, Rohrzucker sich nachweisen lassen. Dies gelang in der That leicht, wie aus den nachfolgenden Angaben zu ersehen ist.

Von noch unreifen Maiskolben, die im August von den Pflanzen abgetrennt worden waren, entfernten wir die Körner und die darunter liegende Gewebeschicht; die dabei übrig gebliebenen fleischigen Theile, die sogenannten Spindeln, wurden mit dem Messer zerkleinert und dann sofort mit Weingeist ausgekocht. Den weingeistigen Auszug verarbeiteten wir in der früher beschriebenen Weise. Aus dem dabei erhaltenen Strontianniederschlag liess sich leicht Rohrzucker in Krystallen gewinnen. Die Krystalle gaben die oben angegebenen Reactionen. Die Untersuchung im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine wässerige Lösung, welche in 20 ccm. 1,200 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $22,7^{\circ}$ S.-V. nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +65,5^{\circ}$.

Der «Strontianniederschlag» schien neben Rohrzucker andere Kohlenhydrate nicht, oder doch wenigstens nur in sehr geringer Menge zu enthalten.

F. Grüne Pflanzen von Avena sativa (Hafer).

Die Haferpflanzen, die wir für den Versuch verwendeten, wurden im Juli dem Felde entnommen, in einer Wachstumsperiode, in welcher die Aehrenbildung noch nicht begonnen hatte. Sie wurden über dem Boden abgeschnitten, mit einem sogenannten Wiegemesser möglichst gut zerkleinert und dann

sofort mit Weingeist von ca. 90 Volumprocent ausgekocht. Der weingeistige Auszug wurde in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Der dabei erhaltene voluminöse «Strontian-niederschlag» liess sich schwer auswaschen. Bei der Zerlegung mittelst Kohlensäure lieferte derselbe eine ziemlich stark gefärbte Flüssigkeit, bei deren Verdunstung ein braun gefärbter Syrup resultirte. Dieser Syrup wurde zur Gewinnung von Rohrzucker mit kochendem 95%igen Weingeist behandelt. Die so gewonnene Lösung musste einer wiederholten Reinigung (durch Eindunsten und Wiederausziehen mit kochendem Weingeist) unterworfen werden, ehe der Rohrzucker daraus krystallisirte. Der durch Umkrystallisiren aus verdünntem Weingeist gereinigte Zucker gab die oben angegebenen Reactionen. Die Untersuchung im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, die in 10 ccm. 0,300 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $11,5^{\circ}$ S.-V. nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 66,3^{\circ}$.

Die Ausbeute an Rohrzucker war nicht gross; aus 3 kg. frischer Haferpflanzen erhielten wir nur etwa 0,5 gr. reine Rohrzuckerkrystalle (doch waren die Reinigungsoperationen mit starkem Substanzverluste verbunden; die ursprünglich vorhandene Rohrzuckerquantität war also ohne Zweifel bedeutend grösser).

Den braun gefärbten Rückstand, welcher übrig geblieben war, als der bei Verarbeitung des «Strontianniederschlags» erhaltene Syrup behufs Extraction des Rohrzuckers wiederholt mit kochendem 95%igen Weingeist behandelt wurde, lösten wir in Wasser und behandelten die Lösung zur Entfärbung mit Thierkohle. Da die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure einen, allerdings nicht starken, Niederschlag gab, so setzten wir dieses Reagens zu, solange noch ein Niederschlag entstand, befreiten das Filtrat durch Barytwasser von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und dunsteten es sodann im Wasserbade zum dünnen Syrup ein, nachdem es zuvor noch durch Ammoncarbonat von einer geringen, darin noch vorhanden Baryt- oder Strontianmenge befreit worden war. Den Syrup gossen wir in absoluten Alkohol, wobei eine sehr starke Fällung entstand.

Die gefällte Substanz wurde durch 7—8 maliges Wiederauflösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol gereinigt; behufs Entfärbung wurde noch mehrmals Behandlung mit Thierkohle eingeschaltet.

Das so gewonnene Produkt stimmte im Verhalten mit der von Frankfurt und mir¹⁾ aus grünen Roggenpflanzen dargestellten Secalose (wahrscheinlich $C_{16}H_{32}O_{16}$) überein. Es bildete eine völlig weisse, in Wasser sehr leicht lösliche Masse, welche mit Resorcin und Salzsäure die sogenannte Lävulosereaction gab und nach dem Erhitzen mit einer verdünnten Mineralsäure die Fehling'sche Lösung stark reducirte. Sie war leicht invertirbar durch Säuren und lieferte bei der Inversion allem Anschein nach nur Fruchtzucker (Lävulose, d-Fructose). Ueber die Einzelheiten der bezüglichen Versuche ist Folgendes mitzutheilen: 6,0 gr. des Kohlenhydrats wurden mit $7\frac{1}{2}$ ccm. Schwefelsäure vom specifischen Gewicht 1,156 und ca. 100 ccm. Wasser eine Stunde lang auf 80° erhitzt. Die Flüssigkeit wurde sodann mit Hilfe von Baryumcarbonat von der Schwefelsäure befreit und im Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Den Syrup behandelte ich mit heissem 95%igen Weingeist, wobei derselbe zum grössten Theil in Lösung ging. Die nach dem Erkalten vom Ungelösten abgegossene weingeistige Flüssigkeit lieferte beim Verdunsten einen stark süss schmeckenden Syrup, welcher stark linksdrehend war ($[\alpha]_D$ wurde = ca. -82° gefunden)²⁾ und mit Resorcin und Salzsäure starke Lävulosereaction gab. Das nach bekannter Methode³⁾ dargestellte Osazon des Zuckers schmolz bei 205° und besass also den Schmelzpunkt des Glucosazons. Diese Versuchsergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass bei der Inversion des Kohlenhydrats Fruchtzucker (d-Fructose) entstanden war. Um auf das Vorhandensein anderer Inversionsprodukte zu prüfen, wurde zunächst eine

1) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 537.

2) Berechnet auf Grund einer Bestimmung des Trockensubstanzgehalts der Zuckerlösung, deren Resultat nur als approximativ gelten kann.

3) Wir verfahren so, wie es in unserer ersten Abhandlung auf Seite 541 angegeben worden ist.

Lösung von 2—3 gr. des Kohlenhydrats in ca. 30 ccm. vom specifischen Gewicht 1,15 im Wasserbade auf $\frac{1}{3}$ des Volumens eingedampft. Die Flüssigkeit lieferte, auch nach dem Erkalten, keine Schleimsäure, dagegen enthielt sie viel Oxalsäure, welche leicht in Krystallen zu gewinnen war. Um auch das Vorhandensein von Zuckersäure unter den Oxydationsprodukten zu prüfen, wurde eine Auflösung von 5—6 gr. des Kohlenhydrats in ca. 30 ccm. Salpetersäure vom specifischen Gewicht 1,15 im Wasserbade zum Syrup eingedampft: der Versuch, aus diesem Syrup das saure Kaliumsalz der Zuckersäure darzustellen, gab aber ein negatives Resultat. Auch Mannose liess sich, nach bekanntem Verfahren, unter den Inversionsprodukten nicht nachweisen. Es scheint also, dass bei der Inversion des Kohlenhydrats nur Fruchtzucker entstand. Dass das Gleiche für die Secalose gilt, ist von S. Frankfurt und mir nachgewiesen worden.

Die Untersuchung des Kohlenhydrats im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat: Eine wässerige Lösung, welche in 20 ccm. 1,485 gr. wasserfreie Substanz¹⁾ enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $13,6^{\circ}$ nach links. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = -31,7^{\circ}$, während für Secalose im Mittel $[\alpha]_D = -28,75^{\circ}$ gefunden wurde. Auf die Differenz von ca. 3° kann bei der Uebereinstimmung, welche die beiden Substanzen im übrigen Verhalten und insbesondere auch in der Beschaffenheit der Inversionsprodukte zeigten, nicht viel Gewicht gelegt werden — umsoweniger als alle von uns untersuchten Präparate nicht völlig frei von Asche und demnach nicht absolut rein waren. Es ist also höchstwahrscheinlich, dass unser Produkt identisch mit Secalose ist.

Das Kohlenhydrat, auf welches sich die im Vorigen gemachten Mittheilungen beziehen, fand sich in den Haferpflanzen in weit grösserer Menge vor, als der Rohrzucker; die Ausbeute daran war ungefähr 20 mal so gross, als die Ausbeute an Rohrzucker.

¹⁾ Der Feuchtigkeitsgehalt des für die Untersuchung verwendeten Präparats wurde durch Trocknen im Wasserstoffstrom bei 100° bestimmt.

G. Grüne Pflanzen von *Lolium italicum* (Italienisch Raygras.)

Die zur Untersuchung verwendeten Raygraspflanzen waren im Garten unseres Institutes gewachsen und wurden im Juli geerntet, als sie eine Höhe von ca. 30 cm. über dem Boden erreicht hatten; die Bildung von Blüthen hatte bei ihnen noch nicht begonnen. Sie wurden über dem Boden abgeschnitten, mit Hülfe eines Wiegemessers möglichst fein zerkleinert und dann sofort mit 90%oigem Weingeist ausgekocht. Den Auszug verarbeiteten wir in der früher beschriebenen Weise. Aus dem dabei erhaltenen «Strontianniederschlag» liess sich leicht Rohrzucker in Krystallen gewinnen. Die Krystalle gaben die oben angegebenen Reactionen. Die Untersuchung im Polarisationsapparat gab folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, welche in 10 ccm. 0,333 gr. Substanz enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $12,5^{\circ}$ S.-V. nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +64,8^{\circ}$.

Für ein nur einmal aus verdünntem Weingeist umkrystallisiertes Präparat wurde ein etwas geringeres Drehungsvermögen ($[\alpha]_D = +63,3^{\circ}$) gefunden, vermuthlich deshalb, weil dem Zucker noch etwas von dem linksdrehenden Kohlenhydrat anhaftete, welches neben ihm im «Strontianniederschlag» enthalten war. Dieses andere Kohlenhydrat, welches in starkem Weingeist sich nicht löste und in der früher beschriebenen Weise vom Zucker getrennt wurde, scheint mit der Secalose und also auch mit dem in den Haferpflanzen neben Rohrzucker enthaltenen Kohlenhydrat identisch zu sein. Durch mehrmaliges Fällen mittelst Alkohols aus wässriger Lösung gereinigt und sodann im Exsiccator getrocknet, bildete es eine weisse, in Wasser sehr leicht lösliche Masse, welche mit Resorcin und Salzsäure die sogenannte Lävulosereaction gab und nach dem Erhitzen mit verdünnter Salzsäure die Fehling'sche Lösung stark reducirte. Um zu prüfen, ob auch dieses Kohlenhydrat bei der Inversion Fruchtzucker lieferte, wurden 2—3 gr. davon mit 2—3 ccm. Schwefelsäure vom specifischen Gewicht 1,156 und ca. 50 ccm. Wasser eine Stunde lang auf 80° erhitzt. Die mit Hülfe von Baryumcarbonat von der Schwefelsäure be-

freie Flüssigkeit wurde sodann zum Syrup eingedunstet. Den Syrup behandelte ich mit kochendem 95 ³/₁₀igen Weingeist, wobei er zum grössten Theil in Lösung ging. Die nach dem Erkalten vom Ungelösten abgegossene Flüssigkeit lieferte beim Verdunsten einen süss schmeckenden Syrup, welcher stark linksdrehend war ($[\alpha]_D$ wurde ungefähr $= -88^\circ$ gefunden).¹⁾ Das in bekannter Weise dargestellte Osazon des Zuckers schmolz bei 205° und besass demnach den Schmelzpunkt des Clucosazons. Daraus ist zu schliessen, dass auch dieses Kohlenhydrat bei der Inversion Fruchtzucker (d-Fructose) lieferte.

Die Untersuchung des Kohlenhydrats im Polarisationsapparat lieferte folgendes Resultat:

Eine wässrige Lösung, welche in 10 ccm. 0,8972 gr. wasserfreie Substanz²⁾ enthielt, drehte im 200 mm.-Rohr $12,6^\circ$ S.-V. nach links; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = -24,3^\circ$.

Das aus dem Raygras dargestellte Kohlenhydrat besass also ein etwas geringeres Drehungsvermögen als die Secalose. Die Ursache dafür kann aber darin liegen, dass wir bei der Reinigung dieses Kohlenhydrates, welches nur in relativ geringer Quantität erhalten wurde, die Ausfällung mittelst Weingeist aus wässriger Lösung nicht so oft wiederholen konnten, wie dies bei der Secalose geschehen ist. Gesetzt aber, dass jenes Kohlenhydrat mit Secalose nicht identisch ist, so muss es doch jedenfalls für eine der letzteren sehr ähnliche Substanz erklärt werden.

Wie in den Haferpflanzen, so fand sich auch im Raygras dieses andere Kohlenhydrat zweifellos in weit grösserer Quantität vor, als der Rohrzucker.

Die im Vorigen mitgetheilten Resultate, zu denen wir bei der Untersuchung von neun vegetabilischen Objecten gelangt

¹⁾ Berechnet auf Grund einer Bestimmung des Trockensubstanzgehalts der Zuckerlösung, deren Resultat nur als approximativ gelten kann.

²⁾ Der Feuchtigkeitsgehalt des für die Untersuchung verwendeten Präparats wurde durch Austrocknen bei 100° im Wasserstoffstrom bestimmt.

sind, bringen Bestätigungen für die in unserer ersten Abhandlung ausgesprochenen Schlussfolgerungen.

Die von S. Frankfurt und mir ausgeführte Untersuchung führte u. A. zu dem Ergebniss, dass der Rohrzucker in reifen Pflanzensamen in grosser Verbreitung, wenn auch nur in kleinen Quantitäten, sich vorfindet. Eine neue Stütze für diese Schlussfolgerung bildet die Thatsache, dass auch in den Samen von Gewächsen, die zu den Gymnospermen gehören, nämlich in den Samen der Coniferen, die genannte Zuckerart vorkommt.

Man darf annehmen, dass der Rohrzucker für die Samen als leicht verwendbarer Reservestoff von Wichtigkeit ist, obwohl er in ihnen nur in kleinen Mengen enthalten ist. Er findet sich, soweit dies bis jetzt untersucht worden ist, vorzugsweise im Blatt- und Wurzelkeim vor¹⁾ und kommt wahrscheinlich zur Verwendung, sobald die Entwicklung des Keimlings beginnt. Dass aber während der Entwicklung der Keimpflanzen der Rohrzuckergehalt derselben nicht abnimmt, sondern im Gegentheil sich vermehrt, ist an mehreren Objecten nachgewiesen worden. Den ersten und sichersten Beweis dafür lieferte die Untersuchung der Keimpflanzen von *Lupinus luteus*; in denselben fanden wir Rohrzucker in beträchtlicher Menge, während diese Zuckerart in den ungekeimten Lupinussamen nicht nachgewiesen werden konnte.²⁾ Bei *Vicia sativa* fand sich in 8tägigen Keimpflanzen mehr Rohrzucker vor, als in den ungekeimten Samen; das Gleiche schien bei *Helianthus annuus* der Fall zu sein. Nach Brown und Morris verwandelt sich im Gerstenmalz die bei Umwandlung der stickstofffreien Reservestoffe des Endosperms entstandene Maltose später in Rohrzucker.³⁾ Im Einklang mit obiger Schlussfolgerung stehen die in dieser Abhandlung mitgetheilten Be-

1) Für eine Graminee (*Triticum vulgare*) ist dies mit Sicherheit nachgewiesen worden, höchstwahrscheinlich gilt es auch für die zu den Leguminosen gehörende *Arachis hypogaea*.

2) E. Schulze, Ueber die Bildung von Rohrzucker in Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, Berichte der d. Botan. Gesellschaft, 1889, Bd. VII, Seite 280.

3) Wie schon in unserer ersten Abhandlung erwähnt worden ist.

obachtungen; es gelang uns, bei *Phaseolus multiflorus* und *Ricinus communis* Rohrzucker in denjenigen Theilen der Keimpflanzen nachzuweisen, in welchen die der Umwandlung unterliegenden Reservestoffe vorzugsweise enthalten sind, nämlich in den Cotyledonen bzw. im Endosperm.

Wenn man aber auf Grund dieser Beobachtungen auch annehmen darf, dass in den genannten Objecten bei der Entleerung der Reservestoffbehälter der Rohrzucker eine Rolle spielt, so ist damit noch nicht gesagt, dass dies in allen Keimpflanzen der Fall ist. Es ist sehr wohl möglich, dass bei jenem Vorgang der Rohrzucker zuweilen durch andere Kohlenhydrate, z. B. durch Maltose, vertreten wird.¹⁾

Der bei der Entleerung von Reservestoffbehältern sich bildende Rohrzucker dient in den bezüglichen Objecten als „Wanderstoff“. Dass diese Zuckerart in der Pflanze auch in anderen Vegetationsperioden die gleiche Rolle spielt, ist von früher her schon bekannt (man vergl. unsere erste Abhandlung).²⁾ Ein Beispiel dafür bildet auch das jetzt von uns nach-

¹⁾ In den Berichten der deutsch. Botan. Gesellsch., Bd. XIV, S. 210, macht K. Puriewitsch in seiner Abhandlung über die selbstthätige Entleerung der von den Samen abgetrennten Reservestoffbehälter mit Hülfe einer kleinen Gypssäule, die mit ihrer Basis in Wasser steht, die Mittheilung, dass die dabei erhaltene Flüssigkeit neben direkt reducirenden Kohlenhydraten in den meisten Fällen auch solche enthielt, die erst nach der Inversion die Fehling'sche Lösung reducirten; die Menge der letzteren betrug nach seinen Bestimmungen bei einigen Objecten ca. 20% von der ganzen Kohlenhydratmenge, bei einem anderen nur 2—3% davon. Bei drei Objecten, nämlich bei *Phönix dactilifera*, *Dahlia variabilis* und *Allium Cepa*, wurden nur direkt reducirende Kohlenhydrate vorgefunden. Unter den letzteren kann, neben Glucose, Maltose sich vorgefunden haben, unter den erst nach der Inversion reducirenden Kohlenhydraten Rohrzucker. Die Zahlen, welche Puriewitsch für das Mengenverhältniss zwischen reducirenden und nicht direkt reducirenden Kohlenhydraten angibt, können freilich als genau zutreffende kaum betrachtet werden; denn neuere Erfahrungen haben gezeigt, dass einer genauen Bestimmung der in einem Pflanzenextract enthaltenen invertirbaren Kohlenhydrate in manchen Fällen unübersteigliche Schwierigkeiten entgegenstehen (man vergl. unsere erste Abhandlung, S. 542).

²⁾ Man vergleiche auch W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl. Bd. I, S. 472.

gewiesene Auftreten des Rohrzuckers in der Spindel des Maiskolbens. Die reifenden Maiskörner, in denen Stärkemehl sich anhäuft, müssen das Material für die Stärkemehlbildung aus der Spindel erhalten. Die Annahme, dass der in der Spindel in beträchtlicher Quantität sich vorfindende Rohrzucker in die reifenden Körner übergeht und sich dort in Stärkemehl umwandelt, darf wohl als eine berechnigte gelten.

Auch der in jungen grünen Hafer- und Raygraspflanzen enthaltene Rohrzucker darf wohl als «in der Wanderung begriffenes Kohlenhydrat» angesehen werden. Die genannten Pflanzen, ebenso wie die früher von uns untersuchten Roggenpflanzen, enthielten aber nur wenig Rohrzucker; in weit grösserer Menge fanden sich in ihnen andere leicht lösliche invertirbare Kohlenhydrate vor. Das aus Roggenpflanzen abgeschiedene Kohlenhydrat solcher Art haben wir als Secalose bezeichnet: die Kohlenhydrate aus Hafer- und Raygraspflanzen scheinen mit dieser Secalose identisch zu sein.

In den von S. Frankfurt und mir untersuchten Objecten wurde der Rohrzucker fast ausnahmslos von anderen löslichen invertirbaren Kohlenhydraten begleitet, deren Quantität oft viel grösser war, als diejenige des Rohrzuckers. Das Gleiche gilt auch für die später von uns untersuchten Objecte. Dass diese Erfahrung sowohl bei dem qualitativen Nachweis des Rohrzuckers als auch bei seiner quantitativen Bestimmung berücksichtigt werden muss, sei hier noch einmal hervorgehoben. Die von J. Sachs angegebene mikrochemische Reaction auf Rohrzucker, welche auf der Eigenschaft des letzteren, mit Kupfersulfat und Kalilauge eine blaue Lösung zu geben, beruht, ist unbrauchbar, falls daneben andere lösliche Kohlenhydrate sich vorfinden.¹⁾ Wenn man ferner aus der Glucosemenge, die in einem Pflanzenextract beim Kochen mit einer verdünnten Mineralsäure sich gebildet hat, den Rohrzuckergehalt des Extracts berechnen will, so wird man in den meisten Fällen ganz un-

¹⁾ Dass auch das Vorhandensein von gewissen organischen Säuren oder von mehrwerthigen Alkoholen diese Reaction zu einer trügerischen machen kann, ist in unserer ersten Abhandlung auf Seite 512 erwähnt worden.

richtige Resultate erhalten. Man könnte denken, dass man in solcher Weise wenigstens den Gesamtgehalt des Extracts an invertirbaren Kohlenhydraten genau ermitteln könnte. Aber auch dieses Ziel lässt sich auf diesem Wege in der Regel nicht erreichen, aus Gründen, die schon in unserer ersten Abhandlung auf S. 542 dargelegt worden sind.¹⁾

¹⁾ Man vergleiche auch die Mittheilungen, die ich über diesen Gegenstand in der Chemikerzeitung 1894, Nr. 29, sowie in den Landwirthsch. Versuchsstationen, Bd. 48, Seite 439—441, gemacht habe.

Ueber das Thymin.

Von

Wl. Gulewitsch.

Mit einer Tafel.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. April 1899.)

Das Thymin, $C_5H_6N_2O_2$, wurde von A. Kossel und A. Neumann¹⁾ im Jahre 1893 als Spaltungsprodukt der Thymusnucleinsäure entdeckt; dieselben Verfasser haben das Thymin aus Hefe- und Milznucleinsäure erhalten.²⁾ Von Miescher³⁾ wurde sodann dieser Körper aus Lachssperma und von A. Kossel⁴⁾ aus Störsperma isolirt. Weitere Angaben über die Verbreitung des Thymins im thierischen Organismus fehlen bis jetzt, und die Untersuchungen in dieser Richtung sind desto wünschenswerther, da man nach den neueren Anschauungen von A. Kossel⁵⁾ die Nucleinsäuren in zwei Gruppen einzutheilen hat, deren eine das Thymin als Spaltungsprodukt ergibt («Thymonucleinsäuren»), während die andere («Gruppe der Inosinsäure⁶⁾ und Guanylsäure») diesen Körper nicht liefert.

1) A. Kossel und A. Neumann, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXVI, S. 2754.

2) A. Kossel und A. Neumann, ibid., Bd. XXVII, S. 2217.

3) F. Miescher (bearb. von O. Schmiedeberg), Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 124.

4) A. Kossel, diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 189.

5) A. Kossel, in Liebreich's Encyklopaedie, III. Bd., Artikel: Nucleinstoffe.

6) Hauser, Monatsh. der Chemie, Bd. XVI, S. 190.

7) J. Bang, diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 156.

Darum habe ich auf Veranlassung von Herrn Professor A. Kossel untersucht, ob auch die Nucleinsäure der Häringstestikeln das Thymin bei ihrer Spaltung ergibt. Zugleich habe ich auch die krystallographische Untersuchung des Thymins ausgeführt, was von grosser Wichtigkeit für die Identificirung einer kleinen Menge von dieser Substanz sein kann. Die zu diesem Zwecke nöthigen reinen Präparate von dem aus Störsperma und Thymusdrüse erhaltenen Thymin hat mir Herr Prof. A. Kossel gütigst zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen besten Dank ausspreche.

Das Thymin, welches durch Spaltung der Häringstestikeln beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure¹⁾ entstand, habe ich bei der Trennung des Arginins vom Histidin durch Silbernitrat und Ammoniak (l. c., S. 181) im Silberniederschlage erhalten. Nach Zersetzung des ausgewaschenen Niederschlages mit Schwefelwasserstoff und nach Eindampfen der Lösung krystallisirte das Thymin sogleich nach dem Erkalten aus, während das Histidin in der Lösung blieb. Die Substanz wurde nach Entfärbung mit Thierkohle aus möglichst wenig heissem Wasser umkrystallisirt, wobei sie in Form vollständig farbloser Blättchen erhalten wurde.

Eine andere Portion von Thymin habe ich aus einem Präparate von noch nicht reinem Arginin erhalten, welches vorher mit Phosphorwolframsäure gefällt war. Nach dem Versetzen der Lösung dieses Präparates mit 5%iger Lösung von Quecksilberchlorid wurde das Thymin sowohl im Niederschlage, wie auch im Filtrate davon gefunden und nach Entfernung des Quecksilbers mit Schwefelwasserstoff leicht auf die oben beschriebene Weise vollständig farblos erhalten.

Die beiden Portionen der gewonnenen Substanz hatten folgende Eigenschaften: in heissem Wasser waren sie leicht, in kaltem schwer löslich; bei vorsichtigem Erhitzen sublimirten sie, ohne zu schmelzen, bei stärkerem Erhitzen schmolzen sie (bei 290° schmilzt die Substanz noch nicht) und sublimirten; mit Salzsäure resp. mit Salpetersäure gaben sie keine Ver-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 180.

bindungen; durch Silbernitrat wurden sie nicht gefällt, aber nach vorsichtigem Zusatz von Ammoniak resp. nach Zusatz von Barytwasser zu der Mischung entstand ein voluminöser Niederschlag, der sich im überschüssigen Ammoniak leicht löste.

Durch diese Reactionen wurde die Identität der Substanz mit Thymin bewiesen. Die Stickstoffbestimmung gab auch das mit der Formel von Thymin gut stimmende Resultat:

0,1239 gr. der bei 135° getrockneten Substanz lieferten 23,9 ccm. feuchten N
(10°; 740 mm. Bar.)

		Berechnet für:
Gefunden:		$C_8H_8N_2O_2$
N	22,49%	22,26%

Das Thymin krystallisirt beim Erkalten seiner heissen, wässerigen Lösungen in kleinen, sternförmig oder dendritisch gruppirten kleinen Blättchen; selten scheiden sich auch kurze Nadeln aus. Die trockene Substanz ist dem aus Alkohol krystallisirten Cholesterin nicht unähnlich.

Die weiter unten beschriebene krystallographische Untersuchung wurde von mir im hiesigen mineralogischen Institute ausgeführt. Ich bin Herrn Geheimrath Prof. M. Bauer für die Erlaubniss zur Benutzung der Apparate zu vielem Danke verpflichtet.

Unter dem Mikroskop begegnet man verschiedenen Krystallformen¹⁾ des Thymins. Häufig werden die Krystalle (Fig. 1) beobachtet, worin nur zwei parallele Kanten (a) regelmässig ausgebildet sind, während die zwei anderen gebogen und uneben sind; die Krystalle zeigen die den Kanten (a) parallele Streifung. Die Auslöschungsschiefe und die Axe der kleineren Elasticität ist den Kanten (a) ebenfalls parallel. Die Doppelbrechung stark. Im convergenten Lichte ist der Austritt der ersten Mittellinie sichtbar, doch sind die Farbenringe wenig deutlich ausgesprochen und lassen keine Farbenvertheilung erkennen; die Ebene der optischen Axen ist zu der Kante (a) senkrecht.

Es kommen auch grössere Tafeln vor (Fig. 2), die aus den mehrfach zusammengehäuften kleineren gebildet und durch

¹⁾ In den Zeichnungen bedeutet die punktirte Linie die Richtung der Ebene der optischen Axen; a ist die Richtung der Axe der nach der Länge des Krystalls kleineren Elasticität.

Fig. 1

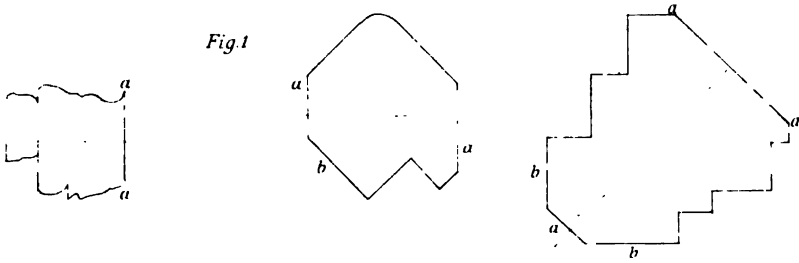


Fig. 3.

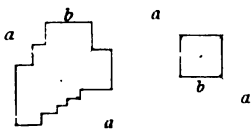


Fig. 2.

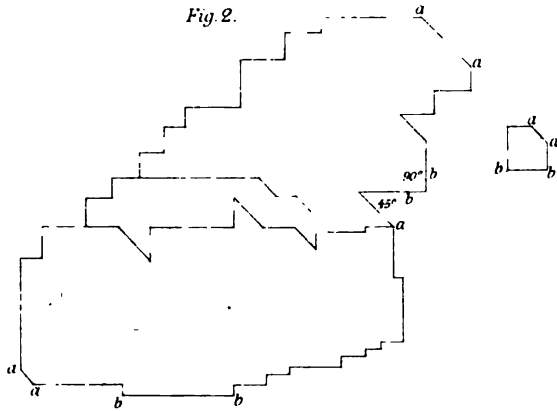


Fig. 4.

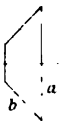


Fig. 5.

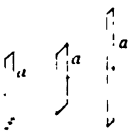


Fig. 6.

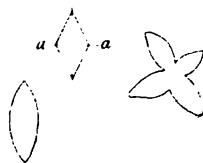


Fig. 7.

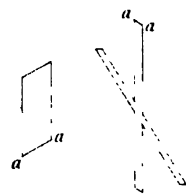
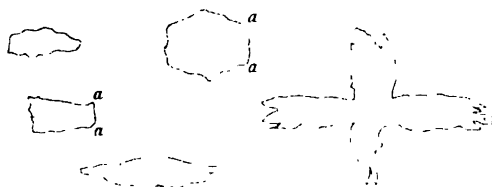


Fig. 8.



zwei Arten von Kanten begrenzt sind; je ein Paar von einer Art (*b*) bildet einen geraden Winkel untereinander und einen von 45° mit der Kante von der zweiten Art. Von diesen letzten Kanten (*a*) wurden in jedem Krystall höchstens zwei einander parallele beobachtet. Die Auslöschungsschiefe ist diagonal, also der Kante (*a*) parallel, die mit der Axe der kleineren Elasticität zusammenfällt und zu der Ebene der optischen Axen senkrecht ist.

Bisweilen sind nur die Kanten (*b*) vorhanden, so dass die Krystalle sich in Quadrate umwandeln (Fig. 3).¹⁾ Es werden auch die trapezischen Formen (Fig. 4) beobachtet. In anderen Fällen sind die Krystalle nach der Kante (*a*) nadelförmig ausgezogen (Fig. 5). Die Richtung der Axe der kleineren Elasticität und der Ebene der optischen Axen ist aus der Zeichnung ohne Weiteres verständlich.

Mehrere Male wurden auch die rhombischen Tafeln beobachtet, die verschiedenartig gruppiert waren und häufig abgerundete stumpfe Winkel hatten (Fig. 6). Der spitze Linearwinkel beträgt in diesen Krystallen 48° . Die Auslöschung der Polarisationsebene ist diagonal. Die kurze Diagonale fällt mit der Axe der kleineren Elasticität zusammen.

In den Krystallen (Fig. 7) beträgt der spitze Linearwinkel 60° . Die kurze Kante ist der Axe der kleineren Elasticität parallel und zu der Ebene der optischen Axen senkrecht.²⁾

Somit stellen alle diese verschiedenartigen Formen dieselbe krystallographische Fläche dar, die nur durch die Flächen mit verschiedenen Indices begrenzt ist. Die Krystalle gehören höchstwahrscheinlich dem rhombischen System an und sind optisch positiv.

Alle drei Präparate von Thymin: aus Thymusdrüsen, aus Störsperma und aus Häringstetikeln, erwiesen sich als kry-

¹⁾ Die Krystalle (Fig. 1) können zufällig auch quadratförmig sein. Dann ist selbstverständlich die Auslöschung der Polarisationsebene nicht diagonal, sondern der Kante (*a*) parallel.

²⁾ Vergl. Fig. 5, wo die lange Kante der Axe der kleineren Elasticität parallel und zu der Ebene der optischen Axen senkrecht ist.

stallographisch identisch; nur waren in verschiedenen Präparaten verschiedene Krystallformen häufiger zu beobachten, was ohne Zweifel von Bedingungen der Krystallisation resp. von winzigen Beimischungen abhängig ist. So bestand z. B. das aus Störsperma gewonnene Thymin fast ausschliesslich aus den Krystallen Fig. 3. Das Thymin aus Thymusdrüsen schied sich überhaupt mit ganz unregelmässigen Kanten aus (Fig. 8) und konnte nur durch die rasche Abkühlung der heissen wässerigen Lösungen in besser ausgebildeten Krystallen erhalten werden.

Bei langsamem Erkalten der heissen Lösungen lieferten zwei andere Präparate von Thymin am meisten die in den Fig. 1—4 abgebildeten Krystalle; bei raschem Erkalten schieden sich besonders häufig die Krystalle von der Form der Fig. 6 aus, während die der Fig. 7 entsprechenden bei dem langsamen Verdunsten eines Tropfens der wässerigen Lösung bei gewöhnlicher Temperatur häufig zu beobachten waren.

Paris, den 7. April 1899.

Kleinere Mittheilungen.

Von
Prof. E. Salkowski.

(Aus dem chem. Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 13. April 1899.)

1. Ueber das erste Produkt der Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure.

Die äussere Erscheinungsform, unter welcher die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure verläuft, ist bekanntlich je nach den Bedingungen der Verdauung wechselnd. Setzt man Mischungen an, welche relativ viel Pepsin und relativ viel Verdauungssalzsäure gegenüber dem Casein enthalten — immer vorausgesetzt, dass das Casein von vornherein in der Verdauungssalzsäure gelöst ist und nicht in fester Form der Verdauung unterworfen wird —, bringt sie in den Thermostaten bei 38—40° und untersucht sie erst nach 24 Stunden, so findet man das äussere Ansehen fast unverändert, nur am Boden der Flasche befindet sich ein geringer Bodensatz von Paranuclein, unter Umständen fehlt auch dieser. Lässt man aber dieselbe Mischung bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen, oder setzt man Mischungen an, welche relativ viel Casein gegenüber dem Volumen des künstlichen Magensaftes enthalten, oder nimmt man einen pepsinarmen künstlichen Magensaft oder vereinigt man beide Bedingungen — mit einem Wort, verschlechtert man die Bedingungen der Verdauung, so findet man nach 24stündigem Verweilen der Mischung im Thermostaten eine kleisterartige, aus Paranuclein bestehende

Masse, welche $\frac{1}{3}$ bis die Hälfte, ja auch noch mehr der Höhe des Flüssigkeitsvolumens einnimmt, sich bei fortgesetzter Verdauung nur sehr langsam löst und wohl kaum jemals vollständig verschwindet. Man hat allen Grund, anzunehmen, dass in beiden Fällen sich zuerst Paranuclein aus dem Casein abspaltet, nur mit dem Unterschied, dass unter günstigen Bedingungen das Paranuclein sofort, ganz oder zum grössten Theil, der weiteren Verdauung anheimfällt und somit gar nicht oder nur zum kleinsten Theil in die Erscheinung tritt.

Es gibt nun aber noch ein primäres Stadium der Verdauung des Caseins, welches, wie es scheint, bisher ganz übersehen worden ist, ein Stadium, in welchem noch kein Paranuclein abgespalten, das Casein aber nichtsdestoweniger schon in eine Albumose übergegangen ist, welche natürlich den ganzen Phosphorgehalt des Caseins in sich birgt. Dass dieses Stadium bisher übersehen worden ist, erklärt sich leicht dadurch, dass keine äusseren Erscheinungen auf eine Veränderung der Lösung des Caseins in der Pepsinsalzsäure hindeuten. Ich beobachtete dieses primäre Verdauungsprodukt zuerst, als ich bei Anwendung von Mischungen mit geringem Pepsingehalt die Verdauung des Caseins durch sehr niedrige Temperatur verlangsamte. Es zeigte sich aber sehr bald, dass niedrige Temperatur durchaus nicht hierzu erforderlich ist, dass vielmehr eine jede Lösung von Casein in Pepsinsalzsäure, mag der Pepsingehalt gross oder gering sein, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei Brutwärme diese eigenthümliche Veränderung zeigt, welche der Abspaltung des Paranucleins vorausgeht, nur mit dem Unterschied, dass der Process mit verschiedener Schnelligkeit verläuft, und zwar um so schneller, je günstiger die Bedingungen der Verdauung sind. Ist der Pepsingehalt erheblich, so können bei Körpertemperatur schon 15, ja selbst 10 Minuten genügen, um das Casein vollständig zum Verschwinden zu bringen. Mit anderen Worten: der Abspaltung des Paranucleins geht in allen Fällen die Umwandlung des Caseins in eine Albumose voraus. Das Paranuclein spaltet sich nicht aus dem Casein, sondern aus der Albumose ab. Es ist natürlich einiger-

massen schwierig, genau die Mischungsverhältnisse und Temperaturverhältnisse anzugeben, bei deren Innehaltung in einem bestimmten Zeitraum die Umwandlung des Caseins in eine Albumose vor sich geht, ohne dass es schon zur Abspaltung von Paranuclein kommt, um so schwieriger, als das Pepsin des Handels ja nicht immer von gleicher Wirksamkeit ist. Wenn ich also einige Versuche beschreibe, so muss ich den Vorbehalt machen, dass der Verlauf bei etwaiger Nachprüfung, was die Dauer betrifft, möglicherweise nicht immer ganz genau den Angaben entsprechen wird.

Am bequemsten ist es, die Verdauung bei Zimmertemperatur vorzunehmen. 2 g. Pepsin Finzelberg (sogenanntes 100%iges) werden mit Wasser angerührt, filtrirt und milchzuckerfrei gewaschen, dann der Rückstand auf dem Filter mit annähernd 150 ccm. Verdauungssalzsäure (10 ccm. Salzsäure von 1,12 D. 990 Wasser) in einen Kolben gespritzt, bis zum nächsten Tag unter Umschütteln bei Zimmertemperatur stehen gelassen, in einen Messcylinder gebracht, mit Verdauungssalzsäure auf 200 ccm. aufgefüllt, durch ein trockenes Filter filtrirt. Die Pepsinlösung ist also, auf das ursprüngliche Pepsin bezogen, 1%ig.

Anderseits werden 20 g. lufttrockenes Casein in der Reibschale in 200 ccm. Wasser + 18 ccm. Halbnormallauge (2% NaOH) gelöst, in einen Messcylinder gebracht, nachgespült, das Volumen durch Wasserzusatz auf 300 ccm. gebracht und colirt oder durch lockeres Papier filtrirt. 200 ccm. der Caseinlösung = ca. 13,33 gr. Casein werden mit 750 ccm. Verdauungssalzsäure versetzt, dann 50 ccm. der obigen Pepsinlösung (= 0,5 gr. Pepsin) hinzugesetzt, so dass das Volumen = 1000 ccm. ist. Die Mischung wird in zwei Theile zu je 500 ccm. getheilt, beide in Flaschen gegossen, die eine Hälfte A in den Thermostaten gestellt, die andere B bei etwas kühler Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Kontrolle ist es zweckmässig, noch 50 ccm. der Caseinlösung mit 200 ccm. Verdauungssalzsäure (ohne Pepsinzusatz) zu versetzen. Diese Mischung C wird neben die Mischung B gestellt.

Nach 24 Stunden ist in A eine grosse Quantität Para-

nuclein abgeschieden, B und C sind äusserlich unverändert. C gibt auf Zusatz von Salzsäure einen reichlichen klumpigen Niederschlag, B einen sehr viel geringeren.

Nach 48 Stunden verhält sich C wie vorher, B gibt mit Salzsäure eine schwache Trübung, welche sich bald zu einer zarten gelatinösen Fällung verdichtet: die Umwandlung des Caseins in eine Albumose ist damit erreicht. Auf die geringe gelatinöse Fällung komme ich noch zurück. Setzt man nun B in den Thermostaten, so findet man nach 24 Stunden reichlich Paranuclein abgeschieden, ebenso auch nach längerer Zeit, meistens 48 Stunden, bei Stehenlassen bei Zimmertemperatur: im letztern Falle wandelt sich die Flüssigkeit in eine kleisterartige Masse um, über welcher nur eine geringe Quantität klarer Flüssigkeit steht. Die Mischung C bleibt sowohl bei Zimmertemperatur, als auch im Thermostaten unverändert. Dass die Mischung B, nachdem sie bei der angegebenen Zusammensetzung 48 Stunden gestanden hatte, nicht Casein enthält, sondern ein spezifisches Verdauungsprodukt, geht aus den Reactionen derselben im Vergleich zu der ebenso zusammengesetzten, aber pepsinfreien Mischung C nach 48stündiger Aufbewahrung hervor.

1. Zusatz von Salzsäure. B: leichte wolkige Trübung, dann schwacher gelatinöser Niederschlag. C: dicker, käsiger Niederschlag von Casein.

2. Zusatz von Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaction, dann Essigsäure; das gleiche Verhalten.

3. Zusatz von Salpetersäure. B: schwache Trübung, beim Stehen ziemlich schnell Gelbfärbung, die auf Zusatz von Natronlauge orange wird. C: dicker käsiger Niederschlag, der sich langsam gelb färbt.

4. Neutralisiren mit Natriumcarbonat, Ansäuern mit Essigsäure, Zusatz von concentrirter Kochsalzlösung bewirkt in B starke Trübung, die sich beim Erhitzen klärt (zumeist nicht völlig), beim Erkalten wiedererscheint.

5. Etwas Natronlauge und Kupfersulfat. B: intensive Biuretreaction. C: schwache Biuretreaction.

6. Zusatz von $\frac{1}{2}$ Volumen Natronlauge von 1,34 D be-

wirkt bei B starke gleichmässige weisse Trübung, bei C keine Veränderung.

7. Mit Na_2CO_3 neutralisirt, schmeckt B intensiv bitter, C hat einen faden Geschmack.

Diese Reactionen zeigen ohne allen Zweifel, dass sich das Casein in eine Albumose umgewandelt hat.

Ueber eine von diesen Reactionen möchte ich noch einige Worte hinzufügen, nämlich die mit $\frac{1}{2}$ Volumen Natronlauge. Sie kommt nicht allein dieser Caseinalbumose zu, sondern lässt sich an jeder nicht zu dünnen Lösung demonstrieren, welche Verdauungsprodukte des Caseins enthält, mag sich schon Paranuclein abgeschieden haben oder nicht. Dieses Verhalten von Caseinverdauungslösung ist mir lange bekannt, aber, wie es scheint, nirgends beschrieben.

Wie bereits erwähnt, kann man diese Umwandlung des Caseins in Albumose auch in sehr kurzer Zeit erreichen, z. B. wenn man gleiche Volumina der oben angegebenen sauren Caseinlösung C und der Pepsinlösung mischt und bei 40° digerirt, schon in einer Viertelstunde. Stets aber handelt es sich um eine spezifische Pepsinwirkung, d. h. Fermentwirkung, denn die saure Caseinlösung ohne Pepsinzusatz kann man wochenlang stehen lassen, ohne dass das Casein sich verändert. Eine allmählich auftretende wolkige Ausscheidung besteht nicht aus Paranuclein, sondern aus Schimmelpilzen. Ebenso wenig führt die Digestion der sauren Pepsinlösung bei 40° zur Albumosebildung.

Labcasein verhält sich ganz ebenso, wie das Säurecasein.

Die Pepsinverdauung des Caseins verläuft somit in drei Stadien: 1. Uebergang des Caseins in eine Albumose, 2. Abspaltung von Paranuclein aus dieser, 3. allmähliche Auflösung des Paranucleins und weitere Verdauung der Albumose. Während es nicht möglich ist, das zweite und dritte Stadium scharf von einander zu trennen — stets geht bei der Abspaltung von Paranuclein aus dem Casein oder, wie man jetzt richtiger sagen muss, aus der phosphorhaltigen Caseinalbumose, mindestens ein Theil des Paranucleins in Lösung, man erhält

stets phosphorhaltige Albumose — während diese Trennung also nie scharf gelingt, ist die Auseinanderhaltung des ersten und zweiten Stadiums sehr leicht, da die Abspaltung des Paranucleins eine gewisse Zeit erfordert und man ausserdem auch, um ganz sicher zu sein, den Process unterbrechen kann, ehe noch alles Casein in Albumose übergegangen ist.

Was die Darstellung der Albumose betrifft, so sind hierüber bis jetzt nur Vorversuche angestellt.

Die Verdauungsflüssigkeit wurde möglichst genau mit Natriumcarbonatlösung neutralisirt, mit Essigsäure angesäuert, filtrirt, eingedampft, von einer geringen Quantität ausgeschiedener gelblicher Tröpfchen abgegossen, die Lösung der Dialyse unterworfen bis zur Entfernung der Chloride, die etwas trüb gewordene Flüssigkeit nochmals filtrirt, in Alkohol absolutus gegossen, durch Zusatz einer Spur Kochsalz eine Ausscheidung bewirkt, diese abfiltrirt und mit Alkohol und Aether entwässert. Das so erhaltene äusserst feine, schneeweisse Pulver löst sich in Wasser mit einer geringen Trübung auf, welche auf Zusatz von Spuren von Kochsalz oder Natriumcarbonat oder Salzsäure verschwindet. Die Substanz ist durch ihr Verhalten zu Essigsäure + Kochsalz und die Biuretreaction als Albumose charakterisirt.

Ich habe vorhin erwähnt, dass die in angegebener Weise erhaltenen Caseinalbumoselösungen mit Salzsäure eine zarte gelatinöse Trübung bezw. Niederschlag gaben, welcher von Casein durchaus verschieden ist. Das äussere Ansehen desselben erinnert an Paranuclein. Es war wegen der kleisterartigen Beschaffenheit dieses Niederschlages sehr schwierig, auch nur eine kleine Quantität desselben in einem zur Analyse geeigneten Zustand zu erhalten, ich will auch nicht behaupten, dass die schliesslich erhaltene Substanz — den eingeschlagenen Weg kann ich hier wohl übergehen —, an welcher ich eine Phosphorbestimmung ausgeführt habe, den Anspruch auf Reinheit erheben kann. Die Phosphorbestimmung ergab für 0,1491 g. bei 110° getrocknet 0,0069 g. Magnesiumpyrophosphat = 1,23% Phosphor. Die Substanz ist also reicher an Phosphor als das Casein und die Abspaltung einer solchen aus der Caseinalbumoselösung durch blosse Salzsäurewirkung ist jedenfalls nicht ohne Interesse.

2. Ueber die Bildung von Skatolessigsäure bei der Eiweissfäulniss.

Bei den in Gemeinschaft mit meinem Bruder H. Salkowski in Münster i. W. ausgeführten Untersuchungen über die Eiweissfäulniss haben wir seiner Zeit in einem Falle — es handelt sich um einen an Fibrin angestellten Versuch von 13tägiger

Dauer, welcher in der Tabelle I auf S. 432 Bd. VIII dieser Zeitschrift mit Nr. IV bezeichnet ist — das Auftreten einer Säure neben wenig Skatolcarbonsäure beobachtet, von welcher festgestellt wurde, dass sie bei 133—134° schmolz und mit Salpetersäure + Kaliumnitrit nicht, wie die Skatolcarbonsäure, einen rothen, sondern einen gelben Niederschlag gab, bezw. in sehr verdünnten Lösungen eine intensive Gelbfärbung. Die Beziehung dieser Säure, welche nur in geringer Menge erhalten war, zu Skatol wurde damals nicht erkannt, weil die Elementaranalyse der zu geringen Menge wegen nicht ausgeführt werden konnte und die Säure im Röhrchen, ziemlich hoch über den Schmelzpunkt erhitzt, beim Destilliren des Rückstandes mit verdünnter Natronlauge kein Skatol lieferte.

Nachdem dann M. Nencki¹⁾ unter den vom Rauschbrandbacillus bei Abschluss von Sauerstoff gebildeten Produkten die Skatolessigsäure entdeckt und beschrieben hatte — in geringer Menge auch des Bacillus liquefaciens magnus und spinosus —, konnte bei der Uebereinstimmung der Eigenschaften — Schmelzpunkt und Reaction mit Kaliumnitrit in saurer Lösung — kaum ein Zweifel sein, dass die damals beobachtete Säure Skatolessigsäure gewesen war.

Zufällig fielen mir nun kürzlich Reste von jenem Versuch Nr. IV in die Hände. Dieselben stellten harzige Massen dar, wie sie sich in grösserer oder geringerer Quantität stets beim Abtreiben der flüchtigen Säuren mit überhitztem Wasserdampf behufs Darstellung der Oxysäuren, Skatolcarbonsäure und Bernsteinsäure bilden (vgl. das Schema in Bd. IX, S. 10 dieser Zeitschrift). Die genauere Betrachtung dieser Massen ergab nun, dass sie reichlich mit Krystallen durchsetzt waren.

Zur Gewinnung der krystallinischen Substanz wurde die harzige Masse mit Wasser ausgekocht, die Lösung durch dichtes Papier filtrirt, welches die harzigen resp. öligen Antheile grösstentheils zurückhielt. Aus dem Filtrat schied sich beim Abkühlen eine noch etwas unreine Säure aus, welche durch Binden an Ammoniak, Behandeln der Lösung mit Knochenkohle, Ausfällen

¹⁾ Sitzungsber. der Wiener Akad. d. W. Bd. XCVIII, Abth. II b, 1889.

mit Salzsäure und wiederholtes Umkrystallisiren aus Wasser in sehr schmalen, etwa $\frac{1}{2}$ cm. langen, fast völlig weissen, unregelmässig gezackten Tafeln vom Schmelzpunkt 133 bis 134° erhalten wurde.

Die Eigenschaften der Substanz entsprachen durchaus den von Nencki für die Skatolessigsäure angegebenen, von welchen, wie Nencki hervorhebt, die Reaction mit Kaliumnitrit und Essigsäure besonders charakteristisch ist. Nencki beschreibt dieselbe folgendermassen:

«Versetzt man eine Lösung, die Skatolessigsäure enthält, mit einer concentrirten Lösung von salpetrigsaurem Kali und säuert mit etwas Essigsäure an, so bildet sich in wenigen Augenblicken ein Magma von feinen gelben Krystallnadeln der Nitrosoverbindung.»

Genau so verhält sich die vorliegende Säure. Wie bereits erwähnt, war diese Reaction auch schon an der früher erhaltenen Säure beobachtet worden, als diese behufs Identificirung mit Skatolcarbonsäure mit Salpetersäure + Kaliumnitrit versetzt worden war.

Die Elementaranalyse¹⁾ der über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab folgende Zahlen:

- 1) 0,2000 g. gaben 0,5111 CO₂ und 0,1070 H₂O;
- 2) 0,1502 g. gaben 9,8 ccm. N bei 17° T. und 760 mm. Bar.

Hieraus ergibt sich:

	Gefunden:	Berechnet für C ₁₁ H ₁₁ NO ₂ :
C	69,70%	69,84%
H	5,94%	5,87%
N	7,54%	7,40%

Die Substanz ist also unzweifelhaft Skatolessigsäure. Aus der Mutterlauge wurde durch Eindampfen noch etwas Skatolcarbonsäure erhalten.

Die Quantität der erhaltenen Skatolessigsäure war nicht unbeträchtlich. Obwohl die Darstellung mit einigen Verlusten verbunden war, wurde immer noch etwas über 1 g. in analysenreinem Zustand erhalten. Da in dem betreffenden Fäulnisver-

1) Für die Analyse bin ich Herrn C. Neuberg zu Dank verpflichtet.

sich nach Ausweis der Tabelle auf S. 432, Bd. VIII dieser Zeitschrift 386 gr. Eiweiss durch Fäulniss zersetzt waren, so beträgt die erhaltene Quantität der Säure mindestens 0,26% des Eiweisses. Nun ist in diesem Falle noch etwas Skatolcarbonsäure aufgetreten und 1,05% Indol festgestellt worden. Daraus geht in Uebereinstimmung mit früher gemachten Befunden hervor, dass die präformirte Skatolgruppe im Eiweiss — wenn man annimmt, dass auch das Indol von dieser stammt — eine nicht unbeträchtliche Grösse darstellt.

Ebenso wurde kürzlich bei einem zu Uebungszwecken angestellten Fäulnissversuch aus Fibrin ca. 0,3 g. Skatolessigsäure erhalten und durch Schmelzpunkt und Reactionen identificirt.

Eine Erklärung dafür, dass in diesen beiden Fällen fast nur Skatolessigsäure statt Skatolcarbonsäure aufgetreten ist, vermag ich nicht zu geben; die Art der Anstellung des Versuches, der Verlauf der Fäulniss, die Verarbeitung der Faulflüssigkeit waren genau so wie in den anderen Versuchen, welche nicht Skatolessigsäure, sondern Skatolcarbonsäure lieferten.

Jedenfalls werden die Beobachtungen von Nencki über das Auftreten von Skatolessigsäure durch die beiden vorliegenden Beobachtungen erweitert; es geht aus denselben hervor, dass die Skatolessigsäure nicht ausschliesslich das Produkt anaërober Bakterien ist, wie man aus den Versuchen Nencki's, welche unter Ausschluss von Sauerstoff angestellt sind, wohl schliessen könnte, sondern dass sie auch unter Bedingungen entstehen kann, in denen auf die Ausschliessung von Sauerstoff nicht Bedacht genommen ist, und in Versuchen, in denen die Bakterien keine anderen sind, als diejenigen, welche sich in der Regel durch spontane Aussaat in mit alkalisirtem Wasser angerührtem Fleisch entwickeln, da mit solchen die Fibrinmischungen geimpft worden waren.

3. Ueber eine langsam verlaufende Eiweisspaltung.

Die erhöhte Aufmerksamkeit, welche in neuerer Zeit der Frage der Bildung von Zucker aus Eiweiss ausserhalb des Körpers zugewendet wird, hat mich an eine alte Beobachtung

erinnert, welche ich nicht veröffentlicht habe, weil sie zu isolirt war. Da ich jetzt Gelegenheit gehabt habe, dieselbe Beobachtung aufs Neue zu machen, scheint es mir angemessen, sie zur Kenntniss zu bringen, wenn auch die Deutung des Befundes noch ganz unsicher ist.

Ich theile zunächst meine älteren Beobachtungen in der Form mit, in der ich sie im Januar 1893 gemacht und zum Zweck der beabsichtigten Publication niedergeschrieben habe.

In Bd. XXV der Zeitschrift für Biologie (N. F. VII), S. 92, habe ich die Veränderungen beschrieben, welche mit Fäulnisbakterien inficirtes, unter Chloroformwasser aufbewahrtes Fibrin allmählich erlitten hatte. Es hatte sich damals ergeben, dass das Fibrin sich im Laufe von 6 Wochen bei vollständiger Abwesenheit von Fäulnisserscheinungen zum grössten Theil zu einer durch Filtriren leicht völlig zu klärenden, eiweissreichen, Spuren von Albumosen und Pepton enthaltenden Flüssigkeit gelöst hatte. Die Flüssigkeit erwies sich beim Ueberimpfen auf Nährgelatine steril. Auch nach weiteren 7 Monaten war die Flüssigkeit noch steril, der Eiweissgehalt hatte sehr abgenommen, und an Stelle desselben waren Protalbumose, Heteroalbumose und Dysalbumose aufgetreten. Ein Rest dieser Flüssigkeit nun, ohne weiteren Chloroformzusatz aufbewahrt, wurde am 20. Januar 1893, im Ganzen 5½ Jahre nach der ersten Untersuchung, aufs Neue untersucht. Die Flüssigkeit war von goldgelber Farbe, erwies sich auch jetzt noch als ganz klar und beim Ueberimpfen auf Nährgelatine steril. Am Boden der Flasche hatte sich ein Niederschlag gebildet, der so fest haftete, dass die Flüssigkeit leicht davon abgegossen werden konnte. Derselbe, auf dem Filter gesammelt und gewaschen, erwies sich nach der mikroskopischen Untersuchung als ausschliesslich aus Tyrosin bestehend. Er wurde in Ammoniak gelöst, die Lösung eingedampft, der Rückstand bei 110° getrocknet und gewogen: das Gewicht betrug 0,171 gr. Die Reactionen bewiesen, dass es sich in der That um Tyrosin handelte, Xanthinbasen waren darin nicht nachweisbar.

Die Flüssigkeit wurde durch Aufkochen von einem noch darin enthaltenen coagulablen Eiweisskörper befreit. Das Filtrat, von

minimal alkalischer Reaction, gab nach völligem Erkalten mit Essigsäure eine nicht unerhebliche, sich ziemlich schnell zusammenballende, klebrige Fällung, von welcher abfiltrirt wurde.

Dieser abfiltrirte und ausgewaschene Niederschlag zeigte folgendes Verhalten:

In Wasser unlöslich, löst er sich in 5%iger Kochsalzlösung fast ganz klar auf, die abfiltrirte Lösung gerinnt nicht beim Kochen, bleibt vielmehr, abgesehen von einer kaum sichtbaren, staubförmigen Trübung, ganz klar. Sie gibt mit Essigsäure Fällung, welche sich beim Erwärmen löst, beim Abkühlen wieder erscheint. Sie gibt Biuretreaction, ferner mit Salpetersäure Fällung, welche sich im Ueberschuss, wenn auch nicht ganz vollständig, wieder löst. Diese Lösung wird beim Stehenlassen bald citronengelb, auf Zusatz von Natronlauge orange.

Das Filtrat von der Essigsäurefällung, durch Eindampfen von Essigsäure befreit, wurde in 2 gleiche Hälften getheilt. Die eine Hälfte wurde weiter eingedampft. Während des Eindampfens schieden sich Häute von Leucin ab, welches leicht als solches zu constatiren war (mikroskopische Form, Sublimirbarkeit, Geruch nach Amylamin bei stärkerem Erhitzen). Die eingedampfte Masse zeigte ausgeprägt süssen, hinterher etwas bitteren Geschmack. Möglicher Weise hängt derselbe vom Leucin ab. Die Existenz eines süssschmeckenden Leucins ist zwar meines Wissens nicht bekannt, da aber das Glycocoll süss schmeckt, so ist es sehr wohl denkbar, dass es auch ein süssschmeckendes Leucin gibt.

Die andere Hälfte wurde etwa bis zur ursprünglichen Concentration verdünnt (Hälfte des ursprünglichen Volumens). Die N-Bestimmung nach Kjeldahl ergab 0,589% N = 3,68% Eiweiss. Es fanden sich in ihr Albumosen, dagegen nur Spuren von Pepton.

Durch diese Beobachtungen ist festgestellt, dass das Fäulnissenzym, abgetrennt von den Fäulnissbakterien, von welchem bisher nur hydrolytische Wirkungen beobachtet waren — wenn man sich der Anschauung anschliesst, dass der Vorgang der Albumose- und Peptonbildung ein hydrolytischer ist — auch tryptische Wirkungen entfalten kann.

Bei Anstellung der Biuretreaction mit dem erwähnten Filtrat von der Essigsäurefällung war mir nun aufgefallen, dass die Reactionsmischung beim Erhitzen eine rein rothe Färbung annahm, wie man sie bei Anstellung der Trommer'schen Probe an schwachen, albumosehaltigen Traubenzuckerlösungen beobachtet. In der That enthielt die Flüssigkeit reichlich Kupferoxydul. Der Zusatz von Rhodanammoniumlösung bewirkte in der mit Salzsäure angesäuerten Reactionsflüssigkeit eine reichliche weisse Ausscheidung von Cuprorhodanid. Auch gewöhnliche Albumosen geben unter diesen Umständen Reduction, aber die Reaction mit Rhodanamon ist bei denselben Concentrationsverhältnissen unvergleichlich schwächer. Die Versuche, die Stärke der Reduction durch die Quantität des gebildeten Cuprorhodanids festzustellen, führte zu keinen brauchbaren Resultaten, da die erhaltenen Werthe zu sehr schwankten.

Einen Anhalt über die Quantität der reducirenden Substanz gewährt indessen folgender Versuch.

5 ccm. der Flüssigkeit wurden mit 10 ccm. Fehling'scher Lösung erhitzt, 10 Minuten im Sieden erhalten. Die Mischung wurde grüngelb, es schied sich feinvertheiltes Kupferoxydulhydrat aus. Nunmehr wurde verdünnt, mit Salzsäure angesäuert, dann mit 2%iger Rhodanammonlösung gefällt; es entstand ein reichlicher weisser Niederschlag. Beim Abfiltriren ergab sich, dass das Filtrat fast vollständig kupferfrei war. Das Kupfer aus 10 ccm. Fehling'scher Lösung war also vollständig reducirt, das Reductionsvermögen entsprach also mindestens 1% Zucker.

So wenig wahrscheinlich damals auch die Annahme war, dass die reducirende Substanz etwa Zucker sein könnte, benutzte ich doch den noch vorhandenen Rest der Flüssigkeit zur Prüfung der Gährfähigkeit.

1) Eine kleine Quantität der Flüssigkeit wurde mit Presshefe gut durchgeschüttelt, in ein Gährungsröhrchen A gefüllt, Quecksilberverschluss, Aufbewahrung im Thermostaten bei 38–39°. Nach 20 Stunden war in der Kuppe des Gährungsröhrchens A ein etwa linsengrosses Gasbläschen zu constatiren, in der Kontrollröhre B ein wenig mehr als stecknadelkopfgrosses.

Nach 44 Stunden war in dem Rohr A 1 cm. der Länge mit Gas gefüllt, kein Fäulnisgeruch zu bemerken, die Gasblase in B nur ganz wenig vergrößert. Das Gas in Röhre A wurde durch Natronlauge völlig absorbiert bis auf einen minimalen Rest; die Flüssigkeit zeigte noch Reduktionsvermögen, ob ebenso stark wie vorher, lässt sich bei dem Mangel quantitativer Bestimmungen nicht sagen.

2) In einem zweiten Versuch wurde noch ein drittes Röhrchen C mit 3%iger Albumosepeptonlösung aus Fibrin (durch Pepsinverdauung) und Hefe aufgestellt.

Nach 24 Stunden war in A ein etwa linsengrosses Bläschen sichtbar, in B ein etwa stecknadelkopfgrosses, in C etwas mehr wie in B.

Nach 48 Stunden war in A $4\frac{1}{2}$ cm. der Röhrenlänge mit Gas gefüllt, B unverändert, in C etwa $2\frac{1}{2}$ cm. mit Gas gefüllt.

Die Mischung C hatte ausgesprochen fauligen Geruch, das Gas wurde von Natronlauge unvollständig absorbiert, es blieb etwa 1 cm unabsorbiert.

Die Flüssigkeit A zeigte keine Spur von Fäulnisgeruch. Das Gas wurde vollständig bis auf ein etwa linsengrosses Bläschen durch Kalilauge absorbiert.

Wenn nun auch der Kontrollversuch mit Peptonlösung durch Fäulnis compliciert war, so steht doch soviel fest, dass die untersuchte Flüssigkeit unter dem Einfluss von Hefe ein ausschliesslich aus Kohlensäure bestehendes Gas in nicht unerheblicher Menge entwickelte. Damit war mein Material erschöpft.

Kürzlich fand ich nun unter den Vorräthen des Laboratoriums eine Flüssigkeit in etwas grösserer Quantität, welche mich in den Stand setzte, meine damalige Beobachtung zu kontrolliren. Die betreffende Glasstöpselflasche trug folgende Bezeichnung:

« Fibrin in Chloroformwasser. Ende April 1888; zerflossen gefunden Ende Juni 88, filtrirt. »

Die Flüssigkeit, Anfang 1899 untersucht, war von bräunlicher Farbe, minimal alkalischer Reaction, klar bis auf einen geringen pulverigen Bodensatz, von welchem abfiltrirt wurde, sie roch kaum noch merklich nach Chloroform. Beim Erhitzen entstand ein nicht unerhebliches Coagulum, das erkaltete Filtrat gab, wie in der ersten Beobachtung, mit Essigsäure, einen Eiweissniederschlag. Das Filtrat von diesem gab leichte Violettfärbung mit Bromwasser, enthielt Albumosen und Pepton, Leucin und Tyrosin, welche leicht durch Eindampfen zu erhalten

waren. Die eingedampfte syrupöse Masse schmeckte süß, hinterher bitter.

10 ccm. des enteimissten Filtrats, das natürlich in Folge des Verdampfens beim Kochen etwas concentrirter war, als die ursprüngliche Flüssigkeit, hinterliessen beim Eindampfen, Trocknen, Versaschen 0,414 gr. organische Trockensubstanz, 0,004 gr. Asche.

10 ccm. des mit Essigsäure ausgefällten enteimissten Filtrats hinterliessen 0,3862 gr. organische Trockensubstanz, 0,0034 gr. Asche.

Das Hauptinteresse richtete sich natürlich auf die Reductions-fähigkeit und die etwaige CO_2 -Entwicklung mit Hefe. Die Versuche über den ersteren Punkt wurden sowohl mit dem enteimissten, als auch mit dem ausserdem noch mit Essigsäure behandelten Filtrat angestellt — beide verhielten sich gleich — die Versuche über den zweiten Punkt nur mit dem enteimissten, um nicht noch eine Complication durch die Anwesenheit der Essigsäure hineinzutragen.

Die Flüssigkeit reducirte Kupferoxyd in alkalischer Lösung, gab jedoch keine Ausscheidung von Oxydul. In der mit Salzsäure angesäuerten Probe bewirkt Rhodanammon einen reichlichen weissen Niederschlag von Cuprorhodanid; Ferricyan-kalium, in geringer Menge zugesetzt, einen rothbraunen Nieder-schlag. Eine zum Vergleich benutzte Albumoselösung wirkt gleichfalls etwas reducirend, jedoch unvergleichlich schwächer.

Beim Erhitzen mit Silbernitrat, Ammoniak und Natron-lauge bildete sich ein schöner Silberspiegel; einen solchen konnte ich mit Albumoselösung nie erhalten, obwohl auch hier die Mischung in Folge der Reduction schwarzbraun wurde.

Ferricyan-kalium wurde in der mit Natriumcarbonat ver-setzten Flüssigkeit in ausserordentlicher Menge zu Ferrocyan-kalium reducirt, Albumoselösung von gleichem Gehalt reducirt zwar auch etwas, aber unvergleichlich schwächer.

Der Sicherheit wegen wurde nun noch Leucin auf seine etwaigen reducirenden Eigenschaften geprüft. Es diente hierzu 1. ein sehr reines Präparat, welches Herr Dr. H. Schwiening¹⁾ seiner Zeit aus Kaninchen-muskeln durch «Autodigestion» erhalten hatte. Dasselbe hat schon

¹⁾ Virchow's Arch. Bd. 136, S. 473.

einmal zu einigen Versuchen¹⁾ gedient. Es ist von demselben damals festgestellt worden, dass es aschefrei ist, bei 259—260° schmilzt und minimal nach links dreht. Ich wählte absichtlich dieses Leucin, weil es gleichfalls durch eine langsam wirkende Fermentation aus Eiweiss gebildet war. 2. Ein Präparat, welches aus mit Wasser erschöpftem, entfettetem Fleisch durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure dargestellt war. Beide Präparate verhielten sich ganz gleich. In verdünnter Natronlauge gelöst, gaben sie mit Kupfersulfat tiefblaue Lösungen, welche, wie zu erwarten war, beim Kochen keine Reduction zeigten, auch keine weisse Trübung nach Zusatz von Salzsäure und Rhodanammon. Mit Natronlauge, Ammoniak und Silbernitrat trat bei starkem Kochen Schwärzung, an einzelnen Stellen auch Andeutung von Silberspiegel ein. Ferricyankalium unter Zusatz von Natriumcarbonat wurde beim Erhitzen insoweit reducirt, dass die mit Essigsäure angesäuerte Lösung sich mit Eisenchlorid tief blau färbte, ohne dass sich indessen, wie bei der «Flüssigkeit», ein Niederschlag ausschied.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die reducirenden Eigenschaften der «Flüssigkeit» jedenfalls nicht auf den Gehalt an Leucin zurückgeführt werden können.

Von weiteren Eigenschaften der Flüssigkeit erwähne ich, dass die α -Naphtolprobe zwar anscheinend positiv ausfiel, aber doch recht schwach, ein Osazon trotz wiederholter Bemühungen nicht in krystallinischer Form erhalten werden konnte.

Die Versuche hinsichtlich der Entwicklung von CO_2 mit Hefe im Gährungsröhrchen hatten ein ziemlich wechselndes Resultat hinsichtlich der Quantität des gebildeten CO_2 .

Gasentwicklung mit völliger oder fast völliger Absorption des gebildeten Gases durch Natronlauge wurde in allen Fällen beobachtet. Das wiederholt erhaltene Maximum an Gas betrug nach 48 Stunden 4—4½ Centimeter der Länge des Gährungsröhrchens. In dem Kontrollröhrchen mit Hefe und Wasser war nach dieser Zeit so gut wie gar kein Gas zu constatiren, wohl aber in der Röhre, welche Albumosepeptonlösung (aus Fibrin durch Pepsinverdauung dargestellt) enthielten. Das Gas betrug hier bis zu 1 Centimeter der Länge des Röhrchens, jedoch war nur etwa die Hälfte bis höchstens $\frac{2}{3}$ davon durch Natronlauge absorbirbar und die Flüssigkeit roch faulig. Was die Ursache des wechselnden Resultates betrifft, so schien das

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 32, S. 471.

Alter der Hefe von Einfluss zu sein. Frisch eingekaufte Hefe — es wurde stets Presshefe benutzt — gab nie eine so starke Gasentwicklung, wie solche, welche 1—2 Tage, vor Verdunstung geschützt (Einwickeln in Schreibpapier, dann in Filtrirpapier, welches gut mit Wasser durchtränkt wurde, dann Pergamentpapier), bei einigen Graden über Null aufbewahrt gewesen war. Man könnte zur Erklärung dieser Differenz annehmen, dass in der aufbewahrten Hefe mehr Spaltpilze vorhanden waren, welche auf das Eiweiss einwirkten, dann hätte aber ein grösserer Antheil des Gases unabsorbirbar sein müssen, wie im andern Fall, da sich bei der Spaltung doch auch Wasserstoff entwickelt und die Flüssigkeit hätte fauligen Geruch zeigen müssen. Beides war nicht der Fall. In jedem Fall trat die CO_2 -Entwicklung langsam ein, nach 24 Stunden war meistens erst etwa $\frac{1}{2}$ Centimeter des Röhrchens von Gas eingenommen. Länger wie höchstens 48 Stunden wurde nicht beobachtet.

Einige Versuche wurden über die Quantität der entwickelten CO_2 angestellt. 100 ccm. des auscoagulirten Filtrats wurden in einem Kolben mit 1— $1\frac{1}{2}$ gr. Hefe versetzt, welcher mit einem zweiten, titrirten Barytwasser enthaltenden Kolben in Verbindung stand. Die entwickelte Kohlensäure musste das Barytwasser passiren, welches seinerseits gegen Absorption von CO_2 aus der Luft durch einen aufgesetzten Will-Varentrapp'schen, Barytwasser enthaltenden Absorptionsapparat geschützt war. Nach 48 bzw. 44 Stunden wurde die CO_2 durch Erwärmen des Gährungskolbens und Durchleiten eines Luftstroms völlig zur Absorption gebracht.

Im ersten Versuch wurden 100 ccm. Barytwasser verwendet, von welchem 10 ccm. 10,6 ccm. Oxalsäurelösung erforderten, von welcher 1 ccm. 1 mgr. CO_2 entsprach. Am Ende des Versuches wurde das Barytwasser¹⁾ filtrirt und titirt. 50 ccm. desselben brauchten zur Neutralisation 2,55 ccm. Oxalsäure, also 100 ccm. 5,1 ccm. Da 100 ccm. des ursprünglichen Barytwassers 106 ccm. Oxalsäure entsprachen, so sind $106 - 5,1 = 101,9$ mgr. CO_2 gebildet.

¹⁾ Das Volumen desselben betrug 99 ccm., 1 ccm. kann man als am Kolben hängengeblieben ansehen.

In einem zweiten Versuch wurden wieder 100 ccm. Barytwasser von welchem 10 ccm. 10,3 ccm. Oxalsäure erforderten, in den Kolben gefüllt. Auch in den vorgelegten Absorptionsapparat wurden 15 ccm. dieses Barytwassers eingefüllt. Da dieses am Ende des Versuches von aussen her nur ganz leicht getrübt erschien, sich beim Durchleiten von Luft aber sehr stark trübte, so hielt ich es für richtiger, dasselbe mit in Rechnung zu ziehen. Es waren also im Ganzen 115 ccm. Barytwasser angewendet, entsprechend 118,45 mgr. CO_2 . Das Barytwasser wurde nach 44-stündiger Digestion bei 38° aus dem Kolben und dem Absorptionsapparat in einem Messcylinder gebracht, nachgespült, das Volumen von 150 mit ausgekochtem Wasser hergestellt, filtrirt. Es ist selbstverständlich, dass alle diese Manipulationen möglichst schnell ausgeführt wurden. 50 ccm. des Filtrates brauchten in 2 Versuchen jedesmal 2,4 ccm. Oxalsäure, die ganze Quantität also 7.2. Somit sind $118,45 - 7,2 = 111,25$ mgr. CO_2 gebildet.

Beide Versuche waren leider durch Fäulniss complicirt; weitere Versuche in dieser Richtung habe ich nicht angestellt, da mir die Durchführung ohne diese Complication bei den mir zur Zeit zu Gebote stehenden Mitteln aussichtslos erschien, ausserdem mein Material bis auf ein Minimum erschöpft war. Man müsste wohl Reinculturen von Hefe anwenden und aseptisch arbeiten. In den vorliegenden Versuchen war dieses nicht erreicht, obwohl der ganze Apparat längere Zeit im strömenden Dampf erhitzt worden war.

Gährversuche mit den beiden oben erwähnten Leucinpräparaten verliefen, wie nicht anders zu erwarten war, gänzlich negativ.

Zur Untersuchung auf Alkohol wurde der Inhalt der beiden Gährungskolben benutzt, sowie die Gährflüssigkeit eines dritten Versuches, bei welchem das enteiwässerte Filtrat von 100 ccm. vor dem Zusatz von Hefe im Kolben kochend auf etwa die Hälfte eingedampft und dann wieder auf ca. 100 ccm. aufgefüllt war, um etwa präformirten Alkohol auszuschliessen. Die betreffenden Flüssigkeiten wurden destillirt, die ersten 10 ccm. für sich aufgefangen. In 2 Versuchen wurde starke Jodoformbildung constatirt, in dem dritten Aldehydbildung bei Erhitzen mit Kaliumchromat und Schwefelsäure. Die späteren Antheile der Destillate gaben nur andeutungsweise Jodoformreaction. Controllversuche mit $1-1\frac{1}{2}$ gr. Hefe und 100 ccm. Wasser ergaben keine nachweisbare Quantität Alkohol.

Schliesslich möchte ich noch eine zufällige Beobachtung nicht unerwähnt lassen. Jedesmal, wenn eine Probe der enteweissten Flüssigkeit (Filtrat) locker bedeckt stehen blieb, trübte sie sich durch Bakterienentwicklung und es trat schon nach 24—48 Stunden ein unverkennbarer, ja sogar ziemlich starker Geruch nach Fruchtäther — Erdbeergeruch — auf (von verschiedenen unbefangenen Beobachtern als solcher constatirt), welcher später durch Fäulnisgeruch complicirt wurde, jedoch immer noch deutlich wahrnehmbar war. Der Versuch, diesen Ester darzustellen, scheiterte an der zu geringen Quantität.

Ist man nun zu der Annahme berechtigt, dass die untersuchte Flüssigkeit gährungsfähigen Zucker enthält? Ich glaube nicht, dass man diese Frage bejahen kann. Es ist zwar stets durch Hefe aus derselben Kohlensäure entstanden und, soweit darauf untersucht ist, auch Alkohol constatirt und sie hatte stark reducirende Eigenschaften, aber es ist nicht nachgewiesen, dass die Quantität des Alkohols der der Kohlensäure entsprach: dies schien vielmehr nicht der Fall zu sein, die reducirenden Eigenschaften waren nach der Behandlung mit Hefe nicht verloren gegangen und es ist nicht gelungen, ein Osazon zu erhalten. Weiterhin fragt es sich, ob für die CO_2 -Entwicklung unter dem Einfluss der Hefe keine andere Erklärung zulässig ist, als die, dass die Flüssigkeit eine Substanz enthält, aus welcher die Hefe CO_2 abspaltet. Wäre es nicht vielleicht auch denkbar, dass die Flüssigkeit eine Substanz enthält, welche die sogenannte Selbstgährung der Hefe in hohem Maasse begünstigte und beschleunigte? Dagegen sprechen die Versuche, in welchen die Quantität der entwickelten Kohlensäure bestimmt wurde. Zu diesen wurde $1-1\frac{1}{2}$ g. Presshefe genommen. Da die Presshefe durchschnittlich bei der Hydrolyse mit verdünnter Säure nach früheren Versuchen von mir 8,1% Zucker liefert,¹⁾ so würde also im Maximum 0,12 gr. Zucker entstehen und dieser bei völliger Vergährung 0,06 gr. CO_2 liefern können. Das ist weniger, als in den Gährversuchen erhalten worden ist, zudem

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XIII, S. 535.

war die Hefe in den Versuchen zum grössten Theil unverändert vorhanden.

Es fragt sich nun weiter, aus welchem Material diese CO_2 liefernde Substanz entstanden ist und durch welchen Vorgang.

Was die erste Frage betrifft, so glaube ich mit Bestimmtheit sagen zu können: das Material kann nur ein Spaltungsproduct des Eiweisses sein. Das Fibrin wird vor der Conservirung mit Chloroformwasser stets so gut gewaschen, dass ihm vom Blute her nichts von reducirenden oder gährungsfähigen Substanzen anhaften kann, und eine andere Quelle kommt nicht in Betracht. Dass das wirksame Ferment aus Fäulnissbakterien stammte, hat insofern eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich, als das Fibrin trotz aller Sorgfalt beim Waschen sicher Fäulnissbakterien enthielt; es ist indessen nicht unbedingt als sicher anzunehmen, da der Gehalt des Fibrins an Fäulnissbakterien jedenfalls als sehr gering anzunehmen ist und eine weitere Entwicklung im Chloroformwasser nicht stattgehabt haben kann. Man ist also nicht unbedingt zu dieser Annahme der Abstammung des tryptisch wirkenden Ferments gedrängt, es erscheint vielmehr auch eine andere Erklärung möglich. Vor einigen Jahren habe ich nachgewiesen, dass die Gewebe eiweiss-spaltende Fermente enthalten, welche in Chloroformwasser ihre Wirkung entfalten, in besonders reichlicher Menge die Leber, aber auch das Muskelgewebe. Ich erinnere daran, dass sich auch aus ganz frischen Kaninchenmuskeln, wenn sie lange in Chloroformwasser aufbewahrt werden, beträchtliche Quantitäten von Leucin ohne jede Spur von Fäulniss bilden.¹⁾ Es ist wohl denkbar, dass Spuren eines solchen Ferments auch im Blut vorhanden sind und sich auf das Fibrin bei Ausscheidung desselben aus dem Blut niederschlagen.²⁾

Es liegt sehr nahe, die Frage aufzuwerfen, ob ähnliche Veränderungen, wie durch dieses langsam wirkende Ferment,

1) H. Schwiening, Virchow's Archiv, Bd. 136, S. 473.

2) Wenn ich nicht irre, bevorzugen Dastre, sowie Arthus und Huber diese Erklärung für ihre Beobachtung über die Veränderungen des Fibrins in Salpeterlösung und Fluornatriumlösung.

nicht auch durch die Wirkung des Trypsins auf Eiweiss hervor-
gebracht werden können. Ich bin mit Versuchen hierüber
beschäftigt und behalte mir ein Urtheil hierüber noch vor.

4. Zur Frage über den Einfluss der Kohlehydrate auf die Eiweissfäulniss.

Um zu prüfen, ob die bekannte antiseptische Wirkung
der Kohlehydrate unter Umständen zu einer völligen Aufhebung
der Fäulniss führen könne, liess ich eine kleine Quantität
frischen Blutes (ca. 80 ccm.) mit Rohrzucker gesättigt, in einem
Glasstöpselglas bei Zimmertemperatur stehen. Bei wiederholter
Prüfung zeigte die Mischung zu keiner Zeit Fäulnissgeruch,
dagegen trat allmählich ein unverkennbarer Geruch nach Essig-
äther auf. Nachdem die Mischung ca. 1 $\frac{1}{4}$ Jahre gestanden
hatte, wurde sie genauer untersucht.

Das vorher flüssige Blut fand sich in eine bräunlich-
schwarze geléeartige Masse umgewandelt, welche ziemlich stark
sauer reagierte und, wie bereits erwähnt, unverkennbar nach
Essigäther roch, von Fäulnissgeruch war absolut nichts zu
bemerken. Es wurden zunächst einige Abimpfungen auf Nähr-
gelatine vorgenommen, die Proben blieben steril. Bei der mikro-
skopischen Untersuchung konnten keine Bakterien entdeckt
werden, dagegen fanden sich zahlreiche Schimmelpilzfäden und
Sporen. Die Abimpfung auf zur Entwicklung von Schimmel-
pilzen geeigneten Nährmedien ist leider versäumt worden.

Zur Untersuchung wurde die gelatinöse Masse mit dem
gleichen Volumen Wasser kräftig durchgeschüttelt, wodurch
eine bräunlich gefärbte, etwas trübe Lösung erhalten wurde.
Eine filtrirte Probe mit etwas Wasser verdünnt ergab bei der
spectroskopischen Untersuchung den Streifen des sauren Häma-
tins, jedoch nur schwach ausgebildet. Der Zusatz von Mineral-
säuren änderte nichts an dem Befund. Das Hämoglobin ist
also durch Säurewirkung gespalten, das Hämochromogen oxydirt,
ein Theil des Hämatins aber wohl weiter verändert.

Die etwas trübe Lösung wurde nun destillirt. Da eine
Vorprüfung an einer kleinen Probe gezeigt hatte, dass sich
die Flüssigkeit ohne störende Gerinnung erhitzen lasse, so

konnte die Destillation direkt vorgenommen werden, was jedenfalls der Destillation im Dampfstrom mit Rücksicht auf die Concentration des Destillates vorzuziehen war. Ein Verlust an Essigäther war dabei nicht ganz zu vermeiden, wie das Auftreten des Geruches nach diesem bei der Destillation zeigte. Es wurde zunächst nur eine kleine Quantität, ca. 25 ccm., abdestillirt, das sauer reagirende Destillat mit Natriumcarbonat schwach alkalisirt und fractionirt. Als erste Fraction wurde das aufgefangen, was bei einer Temperatur bis 93° überging, als zweite das zwischen 93 und 100° Uebergehende, alsdann wurde die Destillation unterbrochen. Die erste Fraction betrug etwa 3 ccm., die zweite etwa 8 ccm.

Die erste Fraction, von neutraler Reaction, roch ausgeprägt nach Essigäther. Da der Versuch, denselben rein darzustellen, aussichtslos war, beschränkte ich mich auf den Nachweis, dass bei der Verseifung dieser Flüssigkeit Essigsäure entsteht; der Nachweis des entstehenden Alkohols wurde leider durch den Alkoholgehalt der Flüssigkeit unmöglich gemacht. Zur Verseifung wurde die erste Fraction in ein Stöpselglas gegossen, welche 20 ccm. Halbnormallauge enthielt, und einige Tage stehen gelassen, dann 10,05 ccm. Normal-säure hinzugesetzt, welche den angewendeten 20 ccm. der etwas zu starken Halbnormallauge genau entsprachen, und mit Halbnormallauge zurücktitirt. Es wurden 2,2 ccm Halbnormallauge zur Neutralisation gebraucht, entsprechend 66 mgr. Essigsäure = 88 mgr. Essigäther.¹⁾ Die erhaltene Lösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und destillirt, das Destillat mit Natriumcarbonat neutralisirt und eingedampft, der Rückstand gab mit arseniger Säure erhitzt starken Kakodylgeruch. Es ist somit nachgewiesen, dass die allmählich abgespaltene Säure Essigsäure war.

Die zweite Fraction roch nach Alkohol, brannte mit

1) Der Umstand, dass die Halbnormallauge ein wenig zu stark war, ist bei der Berechnung nicht in Betracht gezogen. Die Verseifung in der Kälte wurde — nachdem ein Vorversuch mit Essigäther gezeigt hatte, dass sie ausführbar ist — gewählt, um vor der Bildung von Säure durch Einwirkung des Natronhydrats auf den Alkohol sicher zu sein.

bläulicher Flamme, gab mit Jodjodkaliumlösung Jodoform, mit Kaliumchromat und Schwefelsäure intensive Grünfärbung und Aldehydgeruch; ein Streifen zusammengelegten Filtrirpapiers, welcher mit ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung getränkt war, wurde beim Einführen in das betreffende Reagensglas momentan tief schwarz gefärbt. Die zweite Fraction bestand somit der Hauptsache nach aus verdünntem Aethylalkohol. Indol war in derselben nicht nachweisbar.

Der im Fractionskölbchen gebliebene Rest wurde auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft; ein Theil mit arseniger Säure erhitzt: starker Kakodylgeruch, ein anderer in Wasser gelöst, mit ganz verdünnter Salzsäure neutralisirt (minimal saure Reaction), dann Eisenchlorid hinzugesetzt: Rothfärbung der Lösung, beim Kochen Ausscheidung von basisch essigsaurem Eisenoxyd unter Entfärbung der Flüssigkeit.

In den ersten 25 cm. des Destillats sind somit Alkohol, Essigäther und freie Essigsäure nachgewiesen.

Die in dem Destillationskolben gebliebene, ganz schwach sauer reagirende Flüssigkeit wurde durch Wasserzusatz auf 150 ccm., also annähernd das frühere Volumen, gebracht, von einem geringen schwärzlichen Rückstand abfiltrirt. Von dem Filtrat wurde eine Probe mit ca. $\frac{1}{4}$ Volumen concentrirter Kochsalzlösung und einigen Tropfen Essigsäure erhitzt, vom ausgeschiedenen Eiweiss abfiltrirt. Das etwas gelbliche Filtrat zeigte an einem auf Traubenzucker graduirten Halbschattenapparat 1,6% Linksdrehung, der Rohrzucker war also invertirt, ob vollständig, ist nicht untersucht. Auf Zusatz von Natronlauge und wenig Kupfersulfat trat schwache Biuretreaction ein, mehr Kupfersulfat lieferte eine tiefblaue Flüssigkeit, die schon bei gelindem Erwärmen rothes Kupferoxydul in Menge ausschied. Eine andere Probe desselben Filtrats wurde mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt: schwache Trübung durch ausgeschiedene Albumose, das Filtrat gab keine deutliche Biuretreaction.

Die Hauptmenge der filtrirten Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure stark angesäuert, etwa die Hälfte abdestillirt: das Destillat reagirt schwach sauer, enthält Essigsäure, aber weder Phenol noch Indol, gibt noch schwache Jodoformreaction. Der

im Kolben gebliebene Destillationsrückstand wurde mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug verdunstet: in dem dabei bleibenden Rückstand war weder Skatolcarbonsäure, noch eine aromatische Oxyssäure nachweisbar.

Es ist somit festgestellt, dass eine so eminent fäulnissfähige Flüssigkeit, wie das Blut, keine Fäulnisszersetzung erfährt, wenn sie mit Rohrzucker gesättigt ist, soweit sich dieses durch eine vereinzelte Beobachtung feststellen lässt. In der Mischung haben sich nur Schimmelpilze angesiedelt (von denen übrigens makroskopisch nichts zu bemerken war), welche, auf den Rohrzucker einwirkend, aus demselben Alkohol, Essigsäure und Essigäther gebildet haben. Die Spaltung des Hämoglobins ist ein secundärer, auf das Auftreten von Essigsäure zu beziehender Vorgang.

Die Essigätherbildung hat ein gewisses Interesse; allerdings bilden sich auch bei der Gährung des Weinmostes zusammengesetzte Aether, namentlich der sogenannte Oenanthäther, den man in der Regel wohl als ein Gemisch von Capronsäureester und Caprinsäureester ansieht, allein in diesem Falle ist es nicht ausgeschlossen, dass die Säuren schon präformirt im Most vorhanden sind, während das hier sicher nicht der Fall ist, vielmehr augenscheinlich zwei Processe, Alkoholgährung und Essigsäurebildung, welche beide auf Zersetzung des Rohrzuckers beruhen, neben einander verlaufen und die lange Dauer des Vorgangs zur Esterbildung Veranlassung gegeben hat.

5. Ueber den Einfluss von Schwefelwasserstoff auf Kohlenoxydblut.

E. Harnack hat kürzlich u. A. nachgewiesen,¹⁾ dass beim Durchleiten von H_2S durch eine Lösung von CO-Hämoglobin Sulfohämoglobin auftritt, dass somit die Angabe von Hoppe-Seyler, wonach Schwefelwasserstoff allein auf Hämoglobin nicht einwirkt, sondern nur bei Gegenwart von O_2 , in diesem Umfange nicht richtig ist, wenn auch soviel

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 558.

darin richtig ist, dass bei Abwesenheit von Sauerstoff keine Grünfärbung und keine tiefgreifende Zersetzung des Hämoglobins eintritt. Harnack erwähnt dabei (l. c. S. 570), dass Lewisson¹⁾ zwar die Versuche von Hoppe-Seyler auch mit Wasserstoff und Kohlenoxyd wiederholt habe, aber hiermit auch nur bewiesen habe, «dass (was Niemand bezweifelt) eine Zersetzung von Blutfarbstoff durch H_2S nur bei Anwesenheit von O_2 erfolgt». In einer Anmerkung auf derselben Seite sagt Harnack: «Lewisson's Versuche, soweit sie sich auf CO-Hämoglobin beziehen, sind später auch von E. Salkowski (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VII, S. 114) bestätigt worden, aber bewiesen wird doch immer nur, dass unter diesen Umständen keine tiefgreifende Zersetzung, keine Braunfärbung eintritt.»

Ich kann nun nicht anerkennen, dass ich die Angaben von Lewisson bestätigt habe. Zunächst könnte man aus der Form der Anmerkung von Harnack vielleicht schliessen, dass ich selbst auf die Uebereinstimmung meiner Beobachtungen mit denen Lewissons hingewiesen habe. Das ist nicht der Fall: ich konnte das nicht thun, weil ich die Arbeit von Lewisson nicht gekannt habe — sein Name kommt in meiner Mittheilung auch gar nicht vor —, die Schlussfolgerung der «Bestätigung» gehört vielmehr Harnack an und ich kann die Berechtigung dieser Schlussfolgerung nicht anerkennen.

An der von Harnack citirten Stelle sage ich: «Abgesehen von der spectroscopischen Untersuchung haben wir zur Unterscheidung an Kohlenoxydblut und genuinem Blut nur die Natronprobe von Hoppe-Seyler. Es erscheint mir daher nicht überflüssig, eine unterscheidende Reaction mitzutheilen, welche auf der grösseren Resistenz (im Original nicht gesperrt) des Kohlenoxydhämoglobins gegen Schwefelwasserstoff beruht.

Verdünn't man sauerstoffhaltiges Blut so weit, dass eben die Trennung des breiten Absorptionsstreifens (in 1 cm. dicker Schicht) sichtbar wird — etwa 20—24 Tropfen oder 0,9—1 ccm.

1) Virchow's Arch., Bd. 36, S. 15.

Blut auf 50 ccm. Wasser —, versetzt die Lösung im Reagensglas mit $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Volumen gesättigten Schwefelwasserstoffwassers und schüttelt einige Mal durch, so verfärbt sich die Lösung in einigen Augenblicken und wird endlich in wenigen Minuten schmutzig-grün unter Bildung von Schwefelmethämoglobin.

Führt man denselben Versuch mit Kohlenoxydblut aus, so verändert sich die rothe Farbe der Lösung nicht merklich. In beiden Fällen entsteht allmählich ein flockiger Niederschlag, der sich langsam absetzt, der Farbenunterschied ist jedoch trotz der Trübung sehr deutlich.»

In diesen Versuchen ist also relativ wenig Schwefelwasserstoff angewendet und der Luft freier Zutritt gestattet. Dagegen ist in den Versuchen von Lewisson der Sauerstoff der Luft sorgfältig ausgeschlossen, und es ist bei einer Verdünnung des Blutes von 1:100 ein Schwefelwasserstoffstrom durchgeleitet. Die Versuchsbedingungen sind also bei mir ganz andere als bei Lewisson, aus meinen Versuchen kann man meines Erachtens weder etwas für noch gegen diesen Autor entnehmen. Aus meinen Beobachtungen folgt nur soviel, dass CO-Hämoglobin in einer verdünnten Blutlösung sehr viel resistenter gegen Schwefelwasserstoff ist, als O-Hämoglobin. Das habe ich gesagt und das halte ich auch — mit einer gewissen Einschränkung, auf die ich weiter unten zu sprechen komme — aufrecht. Diese grössere Resistenz des CO-Hämoglobins gegen H_2S schliesst sich der bekannten grösseren Resistenz des CO-Hämoglobins gegenüber verschiedenen Reagentien, z. B. Ferrocyankalium + Essigsäure, Tannin, Metallsalze etc., an.

Von meinen damaligen Versuchen her befinden sich noch drei zugeschmolzene Röhren in meinem Besitz, von denen zwei die Kohlenoxydproben enthalten, eine die Probe mit gewöhnlichem Blut. Es hatte ein gewisses Interesse, zu sehen, wie sich die Proben jetzt, nach 16—17 Jahren, verhalten. In allen Röhren befindet sich eine klare, über einem geringen, schmutzig gefärbten Bodensatz stehende Flüssigkeit. In den Kohlenoxydproben ist dieselbe hell kirschroth gefärbt, in der Probe mit gewöhnlichem Blut grüngelb. Die beiden ersten Proben zeigen

ein schönes klares Spectrum von Kohlenoxydhämoglobin, beide ausserdem noch einen schmalen schwachen Absorptionsstreifen, in der einen Probe deutlich ausgeprägt, in der anderen nur angedeutet. Dieser Streifen entspricht seiner Lage nach dem Harnack'schen Sulfhämoglobinstreifen, es hat also eine Einwirkung von H_2S auf das CO-Hämoglobin stattgefunden. Die grünlich-gelbe Flüssigkeit aus dem genuinen Blut zeigt keinen deutlichen Absorptionsstreifen.

Ich habe oben gesagt, dass ich meine damaligen Beobachtungen nur mit einer gewissen Einschränkung aufrecht erhalte. In jetzt angestellten Versuchen hat sich nämlich der Unterschied zwischen genuinem und CO-Blut weit weniger markant herausgestellt als früher, namentlich aber verlief die Einwirkung des Schwefelwasserstoffwassers auf das Oxyhämoglobin weit langsamer. Worin die Ursache dieser auffallenden Abweichung liegt, ob vielleicht in der Art des angewendeten Blutes — wenn man Blut von Schlachtthieren kauft, so kann man hier nie bestimmt wissen, von welchem Thier das Blut stammt —, oder worin sonst, vermag ich nicht zu sagen. Aufs deutlichste geht der Unterschied der beiden Blutarten — CO-Blut und genuines — aber hervor aus der von Katayama¹⁾ beschriebenen Probe mit Schwefelammonium und Essigsäure.

Nach Kenntnissnahme der Arbeit von Lewisson scheint mir übrigens die Sachlage in einem Punkt doch etwas anders zu sein, als man nach der Darstellung von Harnack annehmen könnte. Nach Harnack's Darstellung (l. c. S. 570) könnte es scheinen, dass Lewisson die spectroscopische Untersuchung nicht vorgenommen habe; ich will nicht behaupten, dass diese Deutung unbedingt zwingend ist, aber man kann sich derselben doch schwer entziehen. Dem ist nun aber nicht so. Lewisson hat die Spectraluntersuchung ausgeführt. Indem er seine Versuchsanordnung beschreibt, sagt er (l. c., S. 16): «Jetzt konnte ein starker CO_2 -Strom durch das Cylinderglas streichen (welches nämlich die Blutlösung enthielt), ohne dass

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. 114, S. 53. — Maly's Jahresbericht f. 1889, S. 108.

die Beobachtung durch den Spectralapparat dadurch einen Augenblick unterbrochen zu werden brauchte.»¹⁾ Dasselbe gilt für die Versuche mit Wasserstoff und Kohlenoxyd.

Ferner sagt Lewisson S. 17: «Wurde darauf die bisher verschlossene Röhre mit einem behufs völliger Austreibung des in dem Apparat befindlichen Sauerstoffs schon eine gute Viertelstunde in Gang gewesenen Schwefelwasserstoffapparat in Verbindung gebracht und der Verschluss hier aufgehoben, während er an der bisher mit dem Kohlensäureapparat verbunden gewesenen Röhre hergestellt wurde, so trat gleichwohl keine Veränderung der Blutlösung ein, weder in der Farbe, noch in der Klarheit, noch in dem Verhalten vor dem Spectralapparat.¹⁾ So oft hingegen nach Hinfortnahme des Schwefelwasserstoffapparats der atmosphärischen Luft der Zutritt gestattet wurde, so trat in jedem Falle, gleichgültig ob der Schwefelwasserstoff eine kürzere oder längere Zeit hindurchgeleitet war, sehr bald der Streifen des Hämatins im Roth zu dem breiten des sauerstofffreien Hämoglobins hinzu. Die Blutlösung nahm dabei eine schmutziggrüne Färbung an und zeigte nach einiger Zeit eine deutliche Schwefelabscheidung.» Dieselbe Beschreibung macht Lewisson hinsichtlich des durch Wasserstoff reducirten Hämoglobins und des CO-Hämoglobins.

Der «Hämatinstreifen» ist wahrscheinlich der Sulfhämoglobinstreifen Harnack's. Warum Lewisson im Widerspruch mit Harnack denselben nicht auch bei Ausschliessung von Sauerstoff erhalten hat, bleibt unaufgeklärt.

¹⁾ Im Original nicht gesperrt.

Beitrag zur Lehre vom Hämatoporphyrin des Harns.

Von

Prof. E. Nebelthau.

(Aus der medicinischen Klinik zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 24. April 1899.)

In die medicinische Klinik wurde im Juni 1895 eine Patientin aufgenommen, welche die Zeichen hereditärer Syphilis an sich trug und welche, solange sie sich erinnern konnte, einen burgunderrothen Harn entleerte. Die nähere Untersuchung ergab als die Ursache der Rothfärbung die Ausscheidung eines Farbstoffes, dessen Verhalten an die bekannten Eigenschaften des Hämatoporphyrins erinnerte. Die Patientin, welche Geschwüre im Gesicht und am Kopfe aufwies, wurde längere Zeit in der Klinik behandelt und die Gelegenheit benutzt, um den Farbstoff in grösserer Menge zu genauerer Untersuchung zu gewinnen.

Der Harn zeigte während der ganzen Zeit der Beobachtung abgesehen von physiologischen Schwankungen bezüglich der Menge und des specifischen Gewichtes stets dasselbe Verhalten.

Er wurde vollständig klar entleert, die Farbe war hell burgunderroth, je nach der Menge an Intensität etwas wechselnd. Die Reaction war stark sauer. Der Urin war frei von Eiweiss, Zucker, Aceton und Acetessigsäure; enthielt stets neben dem rothen Farbstoff reichlich Urobilin.

Die Methoden,¹⁾ welche gewöhnlich zum Nachweis des Hämatoporphyrins dienen, führten auch hier zum Ziel, so die

¹⁾ Vergl. die ausführliche Zusammenstellung über Hämatoporphyrin in Neubauer und Vogel, Analyse des Harns, III. Auflage, bearbeitet von Huppert-Wiesbaden, 1898.

Methoden von Mac Munn,¹⁾ (Fällung mit Bleizucker und Bleiessig), von Salkowski²⁾ und Hammarsten.³⁾ Der mit Barytmischung erzeugte Niederschlag enthielt den Farbstoff und konnte demselben durch salzsauren Alkohol entzogen werden. Die Lösung gab das Spectrum des salzsauren Hämatoporphyrins. Auch durch Natronlauge konnte nach der Methode von Garrod⁴⁾ ein grosser Theil des Farbstoffes mit den Phosphaten ausgefällt werden. Die Lösung desselben in salzsaurem Alkohol ergab das oben erwähnte Spectrum. Auf Zusatz von Alkali oder Ammoniak zu den salzsauren Lösungen wurde ein 4 oder 5bändriges Spectrum beobachtet.

Zur Gewinnung des Farbstoffes wurden anfangs grosse Mengen Harns nach der Methode von Salkowski⁵⁾ mit Baryt ausgefällt, der Niederschlag ausgewaschen und mit salzsaurem Alkohol ausgezogen. Durch Verdünnen des sauren Auszuges mit Wasser fällt ein Theil des Farbstoffes in braunen Flocken aus, während offenbar ein grosser Theil bei diesen Manipulationen zersetzt wird.

Deshalb wurde die Darstellung des Farbstoffes von mir nach anderen Methoden versucht.

Zur Ausfällung desselben aus dem Harn wurde zunächst essigsames Zink benutzt. Die Ausfällung des Farbstoffes gelingt jedoch auf diese Weise bei saurer Reaction nicht quantitativ, während man durch Neutralisiren des Harns dieselbe vervollständigen kann.

Das stets gleichzeitig im Urin vorhandene Urobilin wird um so mehr in Lösung gehalten, je saurer der Harn reagirt.

Der Zinkniederschlag löst sich in Ammoniak, und man erhält die Absorptionsstreifen des von Hammarsten⁵⁾ beschriebenen Zinkhämatoporphyrins. Die Lösung des Niederschlages

1) Mac Munn, Proc. Royal-Soc.; 1883, Bd. XXXV, S. 394. Brit. Med. Journal 1883, S. 1060.

2) Salkowski, d. Zeitschr., Bd. XV, S. 286, 1891.

3) Hammarsten, Scand. Arch., Bd. III, S. 319, 1892.

4) Garrod, Journ. of Physiol., Bd. XIII, 1892, S. 603, Bd. XVII, 1884/95, S. 349.

5) l. c.

in salzsaurem Alkohol geht nur langsam vor sich und offenbar unter theilweiser Zerstörung des Farbstoffes. Das Spectrum der Lösung entspricht dem des salzsauren Hämatoporphyrins.

Nach dem Auswaschen und Trocknen des mit Zinkacetat erhaltenen Niederschlages wurde derselbe mit Schwefelammonium zerlegt resp. ausgezogen und die Lösung nach dem Verdunsten des Ammoniaks mit Essigsäure gefällt.

Durch wiederholtes Lösen des erhaltenen Niederschlages mit Ammoniak und Fällung mit Essigsäure konnte eine ziemlich grosse Menge eines flockigen und gleichmässig braun aussehenden Niederschlages gewonnen werden, welcher mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet, einen dunkelbraunroth glänzenden, harten Körper darstellte. Derselbe war leicht löslich in Ammoniak und Natronlauge, in Spuren löslich in Eisessig und Mineralsäuren, unlöslich in Wasser, Alkohol und Aether. Nach der Behandlung mit Wasser in geringem Grade in Alkohol löslich, ebenso in essigsauerm Aether.

Der Stickstoffgehalt dieses Präparates betrug 10,22% (volumetrisch).

0,2160 gr. Substanz hinterliess 0,0106 gr. Asche = 4,9%.

Die Asche enthielt Phosphorsäure, Calcium, Zink, Eisen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen erwies sich schliesslich zur Ausfällung des Farbstoffes die Essigsäure als ein sehr einfaches und vollkommenes Mittel, zumal bei dieser Art der Ausfällungen das Urobilin vollständig in Lösung gehalten wurde.

Ca. 24—40 Stunden nach Versetzen des Harnes mit einigen ccm. Eisessig (5 ccm. auf 100 ccm. Harn) hat sich der Farbstoff am Boden des Gefässes als ein lockerer Niederschlag oder aber auch in eine Nubecula eingeschlossen, mit einigen Harnsäurecrystallen vollständig abgesetzt. Der Niederschlag mehrerer Tagesportionen wird durch die Centrifuge gesammelt, mit Wasser ausgewaschen und mit Natronlauge behandelt. Es entsteht eine tiefdunkelrothe Lösung des Farbstoffes, welche nach dem Filtriren wiederum mit Essigsäure angesäuert wurde. Dabei fällt der Farbstoff in dicken braunen Flocken

zu Boden, während die darüber stehende Flüssigkeit zunächst einen braunrothen Farbenton zeigt. Der so ausgefällte Farbstoff wird auf dem Filter gesammelt, in Wasser gewaschen und nun in möglichst wenig Natronlauge von Neuem gelöst, um wiederum mit Essigsäure ausgefällt zu werden. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nur noch eine geringe braune Färbung zeigt. Der Niederschlag wird jetzt nach dem Lösen in Natronlauge der Dialyse gegen destillirtes Wasser ausgesetzt, solange bis die Farbstofflösung neutral reagirt. Aus der neutralen Lösung wird der Farbstoff jetzt wiederum durch Essigsäure ausgefällt, auf dem Filter gesammelt und mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen. Dabei erweist sich der Farbstoff nach der Behandlung mit Wasser als nur wenig in Alkohol und Aether löslich.

Der nunmehr im Vacuum über Schwefelsäure getrocknete Farbstoff zeigt eine dunkelrothbraune, glänzende Bruchfläche, und ist in Wasser, Alkohol und Aether unlöslich.

Durch Salzsäure, Schwefelsäure und Eisessig gehen äusserst geringe Mengen des Farbstoffes in Lösung. In Ammoniak und Kalilauge löst sich derselbe leicht.

Von dem so gewonnenen Farbstoff wurden Asche- und Stickstoffbestimmungen ausgeführt, letztere nach Kjeldahl. Die Resultate waren die folgenden:

Präparat II.	0,1356 gr. Substanz	ergaben	0,01358 gr. N	=	10,00%
	0,3036 gr.	„	0,02954 „ N	=	9,7%
	0,0693 „	„	0,0024 „ Asche	=	3,4%
Präparat III.	0,0967 „	„	0,00966 „ N	=	9,9%
	0,1530 „	„	0,01456 „ N	=	9,5%
	0,7804 „	„	0,0240 „ Asche	=	3,07%

Die Asche enthielt Phosphorsäure, Calcium und Eisen. Letztere Beobachtung gab Veranlassung zu einer quantitativen Bestimmung des Eisens auf colorimetrischem Wege nach Umwandlung desselben in Rhodaneisen. Es wurde dazu das von mir, auf Anregung von Prof. Kossel, zur Hämoglobinbestimmung empfohlene Wolff'sche Colorimeter benutzt und ein Eisengehalt von 0,37% für den Farbstoff ermittelt.

Der Harn zeigte drei Absorptionsstreifen, welche der Lage nach annähernd den Absorptionsstreifen 2,3,4 des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung entsprachen: von 4 an nach rechts war das Spectrum verdunkelt. Die salzsaure alkoholische Lösung des dargestellten Farbstoffes bot das Spectrum des salzsauren Hämatoporphyrins dar. Die alkalisch gemachte Lösung des salzsauren Farbstoffes liess die bekannten 4 resp. 5 Absorptionsstreifen des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung erkennen. Die Lösung des frisch durch Essigsäure gefällten Farbstoffes in Alkohol oder auch in essigsaurem Alkohol zeigte 2, manchmal auch wohl 4 Absorptionsstreifen. Waren nur 2 Streifen vorhanden, so entsprachen dieselben der Lage nach annähernd den Streifen des metallischen Hämatoporphyrins; waren 4 Streifen nachweisbar, so zeigten dieselben annähernd das Verhalten des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung.

Bei Anwesenheit von Zink in der alkalischen Lösung waren stets nur 2 Absorptionsstreifen vorhanden, welche eine ähnliche Lage aufwiesen, wie sie für das metallische Hämatoporphyrin angegeben wird. (Hammarsten,¹⁾ Garrod.¹⁾

Das genauere spektroskopische Verhalten der Farbstofflösungen wurde mit einem Krüss'schen Apparat, den Herr Prof. Müller die Freundlichkeit hatte, mir zur Verfügung zu stellen, geprüft.

Die Absorptionsstreifen in salzsaurem Alkohol zeigten bei einer Dicke der Flüssigkeitsschicht von 20 mm. dieselbe Wellenlänge, welche von Garrod für die alkoholische Lösung des salzsauren Hämatoporphyrins angegeben worden ist. Die Wellenlänge für den ersten Streifen betrug $\lambda = 597-587$, die für den zweiten $\lambda = 557-541$, während die Wellenlänge des Schattens vor dem letzteren bei der geringen Löslichkeit des Farbstoffes, nicht scharf bestimmt werden konnte.

Zur spektroskopischen Untersuchung des Farbstoffes in alkalischer Lösung wurde eine 0,1% ige ammoniakalische Lösung benutzt. Die Dicke der Flüssigkeitsschicht betrug

¹⁾ l. c.

10 mm. Bei genannter Concentration wurde ein gut begrenzter Absorptionsstreifen zwischen C und D wahrgenommen; sodann begann dicht vor D ein breites Band, welches sich bei weiterer Verdünnung der Lösung aus drei Streifen zusammengesetzt ergab. Der letzte Streifen liess sich auch bei dieser Concentration schon nach violett scharf abgrenzen.

Die Lage der Fraunhofer'schen Linien war bei dem benutzten Apparat die folgende:

C = 14,19, D = 16,05, E = 18,52, b 19,05, F = 20,86.

Das Resultat der Begrenzung der Streifen in Zahlen ausgedrückt war demgemäss:

1. 15,16—15,45.
2. 15,95—20,22.

Nach der Verdünnung der Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser wurde folgende Begrenzung der Absorptionsstreifen festgestellt:

1. 15,18—15,49. $\lambda = 621-610$.
2. 16,02— ?
3. 17,41—18,47. $\lambda = 555-528$.
4. 19,21—20,14. $\lambda = 514-498$.

Nach einem Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung verschwanden die beiden äusseren Streifen, während die beiden mittleren scharf begrenzt und verbreitert hervortraten. Die Begrenzung derselben war folgende:

1. 16,02—16,71. $\lambda = 590-572$.
2. 17,12—18,84. $\lambda = 562-521$.

Nach 48 Stunden zeigte die Lösung im Dunkeln aufbewahrt folgende Begrenzung der Absorptionsstreifen:

1. 16,14—16,84. $\lambda = 587-569$.
2. 17,21—18,81. $\lambda = 560-522$.

Bei weiterer Beobachtung fiel es auf, dass die Lage und Breite der Absorptionsstreifen nicht nur abhängig ist von der Concentration und dem Alter der Lösung, sondern auch von der Menge des zur Lösung angewandten Alkali oder Ammoniak, wie es bereits Garrod¹⁾ für die Lösung des Hämatoporphyrins angegeben hat.

Zu den folgenden Bestimmungen wurde daher eine 0,1 %ige

¹⁾ l. c.

Lösung benutzt, welche 2 Theile Ammoniak in 100 Theilen Wasser enthielt. Die Begrenzung der Absorptionsstreifen war:

1. 15,20—15,46. $\lambda = 620-611$.
2. 16,00— ?
3. ?
4. 18,73—20,37. $\lambda = 523-494$.

Nach Zusatz von dem gleichen Volumen Ammoniaklösung angegebener Concentration wurden die folgenden Verhältnisse festgestellt:

1. 15,20—15,45. $\lambda = 620-611$.
2. 16,12— ?
3. ? —18,76.
4. 19,21—20,21. $\lambda = 514-497$.

Nach Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung war die Lage der zwei entstandenen Streifen die folgende:

1. 16,10—16,80. $\lambda = 588-570$.
2. 17,19—19,03. $\lambda = 560-517$.

48 Stunden später:

1. 16,30—17,08. $\lambda = 583-563$.
2. 17,46—18,89. $\lambda = 554-520$.

Nach 48 Stunden waren die Absorptionsstreifen der ammoniakalischen Lösung weniger scharf von einander zu trennen und wie folgt verschoben:

1. 15,37—15,67.
2. 16,17— ?
3. ? —18,70.
4. ? —20,40.

Nach Verdünnung mit der gleichen Menge Wasser, sodass jetzt eine 0,025 %ige Farbstofflösung zur Untersuchung vorlag, änderte sich die Grenze der Absorptionsstreifen wie folgt:

1. um 15,44. $\lambda = 611$.
2. 16,21—16,91. $\lambda = 585-568$.
3. 17,50—18,83. $\lambda = 553-521$.
4. 19,41—20,31. $\lambda = 511-495$.

Nach Zusatz von einem Tropfen ammoniakalischer Zinkacetatlösung zu dieser letzten Lösung war die Lage der beiden jetzt entstandenen Streifen:

1. 16,15—16,98. $\lambda = 586-565$.

2. 17,39—18,85. $\lambda = 552-521$.

Ein ähnlicher Wechsel in der Lage der Absorptionsstreifen des dargestellten Farbstoffes abhängig von der Concentration, von dem Gehalt derselben an Alkali und von dem Alter derselben wurde noch in anderen Versuchen, so auch nach Lösung des Farbstoffes in Natronlauge constatirt. Die verschiedenen Angaben Garrod,¹⁾ Saillet,²⁾ Zoja³⁾ über die Lage der Absorptionsstreifen des Harnhämatorporphyrins erscheinen nach diesen Erfahrungen verständlich.

Die Eigenschaft des Farbstoffes, durch Essigsäure ausgefällt zu werden, konnte zu einer direkten quantitativen Bestimmung desselben mit Hülfe des oben schon erwähnten Colorimeter benutzt werden. An dem Apparat, den ich auf dem 5. Congress für innere Medicin demonstrierte, habe ich seitdem, wie ich kurz in der Sitzung des ärztlichen Vereins zu Marburg vom 12. Januar 1898 angegeben,⁴⁾ eine Vereinfachung angebracht, welche sich gut bewährt hat. Bezüglich der Beschreibung des Apparates verweise ich auf die Abhandlung des 15. Congresses für innere Medicin S. 557. Hier sei kurz die erwähnte Vereinfachung hervorgehoben. Dieselbe besteht darin, dass die Vergleichslösungen (Co-hämoglobinlösung oder sonstige Farbstofflösungen) in Kammern eingeschlossen werden, welche nach dem Princip der Zeiss'schen Blutkörperchen-Zählkammer angefertigt sind.

Die Höhe der Kammer, welche von Herrn E. Leitz in Wetzlar geliefert wurde, betrug genau 0,25 mm.

Nach luftdichtem Abschluss derselben mit Wachs und Damarlack kann die einmal hergerichtete Kammer, welche in eine unter dem Schutzkasten angebrachte Schienenvorrichtung eingeschoben wird, zu zahlreichen Versuchen benutzt werden.

Dieselbe tritt an Stelle des Cylinderglases, welches nach der früheren Angabe mit der verdünnten Vergleichslösung beschickt wurde, und die zu untersuchende Farbstofflösung wird

1) l. c.

2) Saillet, *Revue de médecine*, Bd. 16. 1896.

3) Zoja, *Arch. Ital. di clin. medica*. 1893.

4) Berlin. *Klin. Wochenschrift* Nr. 37. 1898.

jetzt in dem graduirten Cylinder auf die in der Kammer befindliche Farbstofflösung eingestellt.

Aus der Höhe der Vergleichskammer, welche mit der Farbstofflösung von bekanntem Gehalt gefüllt ist, und der Höhe der Flüssigkeitssäule wird der Gehalt dieser Flüssigkeit an Farbstoff in Procent berechnet nach der Formel:

$$x = \frac{0,25 \cdot 1,0}{y}$$

(0,25 Höhe der Vergleichskammer, 1,0 = Procentgehalt der Vergleichslösung an Farbstoff, y = Höhe der Flüssigkeitssäule in dem graduirten Cylinder.)

Bei meinen Bestimmungen kam eine Farbstofflösung als Vergleichslösung zur Anwendung, welche in 10 ccm. genau 0,1 gr. Farbstoff gelöst enthielt. Als Lösungsmittel diente möglichst wenig Natronlauge. Von der Tagesmenge wurden je 100 mit 5 ccm. Eisessig im Spitzglase versetzt.

Nach 48 Stunden wird vom Sediment die überstehende Flüssigkeit möglichst abgossen, das Sediment mit Hülfe der Centrifuge gesammelt, mit Wasser gründlich gewaschen, in Natronlauge gelöst und genau mit Wasser auf 50 ccm. aufgefüllt. Der ausgeschiedene Harn und Farbstoff belief sich an 11 Tagen auf folgende Mengen:

1.	1100 ccm. Harn	enthielten	0,06215 gr. Farbstoff
2.	1250	„	0,05187 „
3.	1220	„	0,04209 „
4.	1200	„	0,04851 „
5.	1200	„	0,04284 „
6.	1200	„	0,04410 „
7.	1200	„	0,04416 „
8.	1200	„	0,04542 „
9.	970	„	0,02796 „
10.	1220	„	0,03812 „
11.	3600	„	0,0258 „

im Mittel 1130 ccm. Harn enthielten 0,04089 gr. Farbstoff.

Es sei bemerkt, dass die quantitative Bestimmung des Farbstoffes auf dem angeführten Wege offenbar genaue Resultate ergab, da eine abgewogene Menge des Farbstoffes, welche dem Harn zugesetzt wurde, mit Essigsäure ausgefällt und colorimetrisch bestimmt, keine Verluste erkennen liess.

Es handelt sich also in unserem Falle um einen Farbstoff, welcher durch sein Verhalten gegen Alkalien und Essigsäure gut charakterisirt ist. Gefällt wird derselbe aus dem Harn und seinen alkalischen wässerigen Lösungen durch Essigsäure, aus seinen alkalischen Lösungen auch durch Salzsäure und Schwefelsäure.

Durch Behandlung mit diesen Mineralsäuren und Alkohol wird Lösung eines geringen Theiles des Farbstoffes erzielt; die Lösung zeigt spectroscopisch das Verhalten des mineral-sauren Hämatoporphyrins.

Der Farbstoff löst sich in Alkali und Ammoniak und bietet in diesen Lösungen ein vier- oder fünfbänderiges, nicht gleichmässig abgrenzbares Spectrum dar.

Spectroscopisch würde sich der Farbstoff demgemäss ähnlich wie der als Hämatoporphyrin beschriebene Farbstoff des Urins verhalten.

Die Ausfällung des Hämatoporphyrins aus alkalischer Lösung mit Essigsäure vollzogen bereits Nencki und Sieber¹⁾ und Stokvis²⁾, während die Fällung des Hämatoporphyrin aus Harn mit Essigsäure bisher nicht gebräuchlich gewesen zu sein scheint.

Da sich die Essigsäure zur Ausfällung meines Farbstoffes aus dem Harn als sehr geeignetes Fällungsmittel erwies, so wäre in diesem Verhalten, ebenso wie in dem gegen Alkalien, eine weitere Uebereinstimmung mit dem Hämatoporphyrin von Nencki und Sieber vorhanden. Letzteres enthielt nach der von diesen Autoren aufgestellten Formel ($C_{16}H_{18}N_2O_8$) 9,7% N, mein Präparat im Durchschnitt 9,8% N.

Demgegenüber ist der geringe Eisengehalt der Asche wohl kaum bemerkenswerth; es ist die Möglichkeit vorhanden, dass das Eisen in meinem Falle einem Theil des Farbstoffes mehr oder minder fest anhaftete. Die Ausfällung des Farbstoffes mit Essigsäure aus dem Harn wird auch in Zukunft zu em-

¹⁾ Nencki und Sieber, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm., Bd. XXIV, S. 430.

²⁾ Stokvis, Nederland Tijdschrift voor Geneeskunde, 1889, II, p. 413.

pfehlen sein, wenn es sich um Harn handelt, welche der Anwesenheit von Hämatoporphyrin oder diesem nahestehender Farbstoffe verdächtig sind, da die Art der Behandlung wenig eingreifend ist. Ausser in dem beschriebenen Falle gelang es mir noch in drei weiteren Fällen, in denen infolge der Rothfärbung und des spectroscopischen Verhaltens Hämatoporphyrin im Harn vermuthet wurde, den Farbstoff mit Essigsäure zu fällen.

Es handelte sich um den Harn eines Falles von Sulfonalvergiftung, eines Typhuskranken und eines an schwerer Anämie erkrankten Patienten.

Ueber den Eisengehalt der Asche meines Farbstoffes war ich damals noch nicht orientirt, sodass in diesen drei Fällen in der Annahme, es handle sich um gewöhnliches Hämatoporphyrin, die Prüfung auf Eisen unterblieb.

Hierauf wird in Zukunft zu achten sein.

Für die Ausscheidung der grossen Mengen des Farbstoffes konnte in meinem Falle, ebensowenig wie für die Ausscheidung des Hämatoporphyrins in den Fällen von Sobernheim,¹⁾ Neusser²⁾ etc., kein Grund ermittelt werden.

Die hereditäre Syphilis konnte nicht ohne weiteres dafür verantwortlich gemacht werden, zumal sich keinerlei Veränderungen im Bereich des Tractus intestinalis und uropoeticus feststellen liessen.

Die Untersuchung des Blutes ergab eine gute Beschaffenheit desselben. Im Blutserum und in den Faeces konnte nie ein entsprechender Farbstoff nachgewiesen werden.

¹⁾ Sobernheim, Deutsche med. Wochenschrift Nr. 24. 1892.

²⁾ Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch., 84, 3 Abth. 1881.

Ueber Antipecton.

Von

M. Siegfried.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 27. April 1899.)

I. Mittheilung.

Als Antipecton haben Kühne und seine Schüler ein Produkt der Einwirkung des Trypsins auf Eiweiss bezeichnet, welches die Biuretreaction liefert und nicht durch Ammoniumsulfat aussalzbar ist. Als Spaltungsprodukt des Carniferrins habe ich eine Säure, die Fleischsäure¹⁾ erhalten, deren Verhalten fast vollständig mit dem von Kühne für das Antipecton angegebenen übereinstimmt, sodass ich beide für identisch oder für sehr wenig verschiedene Körper angesprochen habe. Hierbei wurden die von Kühne dargestellten Antipectone in Uebereinstimmung mit Kühne als nicht vollständig reine Individuen angesehen, so u. A. der geringe Schwefelgehalt der Antipectone als von Verunreinigungen herrührend betrachtet. Dass man gezwungen ist, das Antipecton für schwefelfrei zu halten, geht, um dies nochmals gegenüber gegentheiligen Anschauungen in der Litteratur hervorzuheben, schon aus dem Umstande hervor, dass das chemische und physiologische Verhalten des Antipectons mit einem Molekulargewichte von über 6000, das sich aus dem von Kühne gefundenen Schwefelgehalte von 0,5% berechnet, nicht im Einklange steht. Wie ich weiter unten zeigen werde, lassen sich aus den Gemischen der Verdauungs-

¹⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 401 und diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 376.

produkte Antipectonpräparate darstellen, welche vollständig schwefelfrei sind.

Das Wesentliche meiner Ansichten über das Antipecton liegt darin, dass bei der pankreatischen Verdauung nur einfache Körper entstehen, nur solche, die in Bezug auf Grösse des Molekulargewichtes mit den bei der Spaltung der Eiweisskörper durch Salzsäure entstehenden Amidosäuren und Basen auf eine Stufe zu setzen sind. Das Antipecton widersteht hiernach deshalb der weiteren Zersetzung durch das Trypsin, weil es kein Eiweiss ist, auf das eiweissverdauende Enzyme einwirken könnten, und nicht etwa, weil es ein im Allgemeinen widerstandsfähiger Körper wäre. Dass die Biuretreaction nicht ein Grund ist für die eiweissähnliche Natur eines Körpers, hat inzwischen H. Schiff¹⁾ gezeigt. Die im Voit'schen Laboratorium von Ellinger²⁾ angestellten Versuche haben bewiesen, dass das Antipecton sich physiologisch nicht wie Albumosen, sondern wie Amidosäuren verhält.

P. Balke³⁾ hat nach Kühne's Vorschrift Antipecton aus Fibrin dargestellt, nach Kühne's Vorschrift mit Alkohol gereinigt und aus solchen Präparaten Salze dargestellt, deren Metallwerthe denen der Salze der Fleischsäure entsprachen. Vor Kurzem sind von Fr. Kutscher⁴⁾ zwei Mittheilungen über das Antipecton erschienen, welche darthun sollen, dass nach Kühne's und Balke's Vorschrift dargestellte Antipectonpräparate Gemische heterogener Körper sind, dass sie Amidosäuren und Basen enthalten. Kutscher gibt in der zweiten Mittheilung an, wörtlich nach den Angaben Balke's zur Gewinnung des Antipectons aus dem Verdauungsgemische verfahren zu sein, und identificirt sein Antipectonpräparat mit dem Balke's, indem er das von ihm verwendete Antipecton «Balke's Antipecton» nennt. Bei dem von Balke benutzten Verfahren, das von dem Kühne's fast nicht verschieden ist, wird die vom Ammonsulfat durch Baryt befreite Lösung der

¹⁾ Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. XIX, S. 298.

²⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXXIII, S. 190.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 248.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 195 und Bd. XXVI, S. 110.

Amidosäuren, Basen und des Antipeptons nach Entfernung des Barytes durch Schwefelsäure eingedampft. Der dünne Syrup wird nach dem Erkalten mit absolutem Alkohol versetzt, bis eine stets entstehende Trübung beim Umrühren nicht mehr verschwindet. Das Filtrat wird unter gutem Umrühren in absoluten Alkohol fliessen gelassen. Zur weiteren Reinigung werden die so erhaltenen Präparate mit Alkohol ausgekocht, wieder in Wasser gelöst und mit absolutem Alkohol gefällt. Weiter unten werde ich über Versuche berichten, die ich vor dem Erscheinen der Mittheilungen Kutscher's angestellt habe, um zu prüfen, ob mit dieser Alkoholmethode constante Präparate erhalten werden können. Hier möchte ich betonen, dass man die angegebenen Vorschriften wohl wörtlich befolgen, aber doch wesentlich verschieden reine Präparate erhalten kann, da, wenn durch das Auskochen mit Alkohol, Lösen und Fällen, eine Entfernung der Amidosäuren und Basen erzielt wird, der Grad der Reinigung von der Dauer des Kochens, Menge des verwendeten Alkohols etc. abhängig sein muss. Dass die Präparate Kutscher's so stark verunreinigt waren, dass er aus ihnen so grosse Mengen Amidosäuren und Basen erhalten hat, lässt nicht verwundern, wenn man die Ausbeute, die Kutscher an Antipepton erhielt, berücksichtigt. 1400 gr. feuchtes, abgepresstes Fibrin lieferten etwas über 200 gr. Antipepton. 1400 gr. feuchtes, abgepresstes Fibrin enthalten etwa 300—350 gr. Trockensubstanz. Nach Entfernung der Albumosen durch dreimaliges Aussalzen mit Ammonsulfat, nach Entfernung des durch Alkohol ausgeschiedenen Niederschlages, der Substanzmengen, welche in dem zum Auskochen, Fällen und Umfällen verwendeten Alkohol bleiben, bei den unvermeidlichen Verlusten beim Arbeiten mit dem grossen Barytniederschlage erhält Kutscher etwa zwei Drittel des angewandten Fibrins an Antipepton. Selbst wenn in den aus 200 gr. Trockenpankreas dargestellten salicylsauren Extracten noch 100 gr. Eiweisssubstanz enthalten wären, wäre die Ausbeute von 200 gr. Antipepton, das nur eins von den vielen bei der Zertrümmerung des Eiweissmoleküls durch die tryptische Verdauung entstehenden Produkten ist, Beweis genug, dass

dieses Antipepton sehr stark mit Amidosäuren und Basen verunreinigt war.

I. Versuche zur Darstellung eines Antipeptons von constanter Zusammensetzung durch Reinigung des Rohantipeptons mit Alkohol.

Bei diesen Versuchen habe ich die Vorschriften Kühne's in mehreren Punkten verlassen. Es sollte versucht werden, Produkte von constanter Zusammensetzung möglichst aschefrei und schwefelarm zu erhalten. Zur Fernhaltung der Aschebestandtheile wurde an Stelle des Natriumcarbonates Barythydrat verwendet. Da durch das zum Aussalzen der Albumosen verwendete Ammonsulfat bei dessen Entfernung durch Barythydrat eine stark ammoniakalische Lösung erhalten wird, resultirt zunächst das Ammoniumsalz des Antipeptons, dessen Zersetzung unter Bildung der freien Säure auf dem Wasserbade nur unvollkommen geschieht. Deshalb habe ich auch versucht, in einem nur wenig Albumosen enthaltenden Verdauungsgemische die Albumosen durch abwechselndes Ausfällen bzw. Auskochen mit Alkohol ohne Verwendung von Ammonsulfat zu beseitigen.

Versuch I. 11 kgr. gut ausgewaschenes, ausgepresstes, feuchtes Fibrin in 2 grossen, je 16 Liter fassenden Kolben mit Barytlösung (6 ccm. kalt gesättigter Barytlösung auf 100 ccm. Wasser) gedeckt. Dazu wurde eine Lösung gegeben, die durch Digeriren von 30 gr. Pankreatinum absolutum E. Merck mit Wasser, Versetzen mit Barytlösung und Filtriren (das Filter wog lufttrocken 10 gr.) dargestellt war. Zur Verhütung von Fäulniss wurde Chloroform und Thymol hinzugefügt. Nach 14 tägiger Digestion bei nur wenig unter 40° schwankender Temperatur wurde filtrirt, das Filtrat nach Ansäuern mit Schwefelsäure aufgeköcht, filtrirt und das Filtrat eingedampft. Nach mehrtägigem Stehen hatte sich eine starke Krystallisation gebildet, von welcher abgesaugt wurde. Aus dem krystallinischen Filter wurde durch Auspressen noch eine weitere Menge des Filtrates gewonnen. Das vereinigte Filtrat wurde mit der doppelten Menge Wasser verdünnt und mit Ammonsulfat bei

ammoniakalischer, neutraler und saurer Reaction gesättigt. Das Filtrat wurde mit Baryt und Kohlensäure behandelt. Die von Ammonsulfat und Baryt freie Flüssigkeit wurde eingeeengt und mit Alkohol versetzt. Nach 16 Stunden liessen sich 2 Schichten trennen, ausserdem waren Krystalle (2. Krystallisation) abgechieden. Um eine möglichst intensive Reinigung durch Alkohol zu erzielen, wurde nicht mit Alkohol ausgekocht, sondern stets die Lösung des Rohantipeptons in siedenden 96%igen Alkohol tropfen gelassen. So wurde die wässrige Schicht in die 4—5fache Menge siedenden Alkohols tropfen gelassen; der von dem schmierigen Bodensatz (gereinigtes Antipepton I) abgegossene Alkohol schied beim Abkühlen Krystalle aus und hinterliess beim Eindunsten einen krystallinischen Rückstand. Das «gereinigte Antipepton I» wurde mit Wasser von 40° übergossen, von Krystallen abfiltrirt und die Lösung wieder tropfenweise in kochenden Alkohol gegeben. Das so erhaltene «gereinigte Antipepton II» wurde in Wasser gelöst, die Lösung in viel absoluten Alkohol eingeführt, abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

3,0284 gr. 48 Stunden bei 105° getrocknete Substanz gaben nach dem Verschmelzen mit Aetznatron und Salpeter, Eindampfen der Lösung der Schmelze mit Salzsäure etc. 0,0312 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,14\%$ S.

Aus einem Theil wurde durch Kochen mit Zinkcarbonat das Zinksalz dargestellt.

0,2860 gr. bei 100° getrocknetes Zinksalz gaben 0,0282 gr. $\text{ZnO} = 7,91\%$ Zn.

Der noch übrige Theil des über Schwefelsäure getrockneten gereinigten Antipeptons II (175 gr.) wurde in 30 ccm. Wasser gelöst. Diese Lösung wurde in 500 ccm. siedenden, 96%igen Alkohols eingetropt und dabei nach je 16 ccm. Lösung 90 ccm. absoluten Alkohols dazugegeben. Der Alkohol hinterliess beim Eindunsten einen schmierigen, keine Krystalle einschliessenden Rückstand. Auch das so gereinigte Antipepton enthielt noch Schwefel. Es gab mit sehr empfindlichem Millon'schen Reagens keine Roth-, sondern nur eine Braunfärbung.

Versuch II. 9,3 kgr. ausgepresstes feuchtes Fibrin wurden mit Barytlösung und E. Merck'schem Pankreatin wie in Versuch I 4 Wochen verdaut. Dann wurde filtrirt, das Fil-

trat mit Schwefelsäure schwach angesäuert, aufgeköcht, filtrirt. In dieser Lösung erzeugte Barytwasser noch eine Fällung von Baryumphosphat, weshalb mit Barytwasser ausgefällt und im Filtrate vom Barytniederschlag das Baryum durch Schwefelsäure genau entfernt wurde. Die zum dünnen Syrup eingedampfte Lösung schied krystallinische Produkte aus, von denen abfiltrirt wurde. Die Lösung enthielt nur sehr wenig Albumosen. Zur weiteren Reinigung wurden von der Lösung je 400 ccm. in 1 Liter siedenden Alkohols getropft, unter allmählichem Zusatz eines weiteren Liters Alkohols. Nach zweistündigem Sieden der Mischung wurde der Alkohol abgessen und die ausgeschiedene Masse (gereinigtes Antipecton I) zu 1 Liter Flüssigkeit in Wasser gelöst und, wie oben beschrieben, in 3 Liter kochenden Alkohols unter Zusatz von weiteren 3 Liter Alkohol gegeben. Das so erhaltene gereinigte Antipecton II wurde noch dreimal, wie angegeben, in Wasser gelöst und in siedenden Alkohol eingetragen. Die Mischung wurde in jedem Falle noch 7 Stunden im Sieden gehalten. Das so gewonnene gereinigte Antipecton V enthielt keine Albumosen und verhielt sich folgendermassen: Es gab sehr intensive Biuretreaction, keine Millon'sche Reaction, nur eine hellbraune Färbung mit sehr empfindlichem Reagens. Sublimat erzeugte keinen Niederschlag, wohl aber Mercurinitrat. Es schmeckte nicht bitter, sondern säuerlich und färbte Lackmus intensiv roth.

Ein Theil wurde mit Zinkoxyd gekocht, das Filtrat mit Alkohol gefällt. Das so erhaltene Zinksalz gab folgende Werthe:

I. 0,2442 gr. bei 100° getrocknete Substanz gaben 0,0313 gr. ZnO
= 10,28% Zn.

Der Rest des Salzes wurde in Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt.

II. 0,1683 gr. der umgefällten Substanz gaben 0,0215 gr. ZnO = 10,24%.

Das mit Alkohol flockig gefällte und über Schwefelsäure getrocknete Antipecton enthielt nur wenig Asche,

1,2935 gr. Substanz gaben 0,0042 gr. Asche = 0,33%.

Dieselbe bestand ganz oder vorwiegend aus Kalk. Die Lösung des Antipectons wurde mit einigen Tropfen Oxalsäure

versetzt, nach längerem Stehen von einem geringen Bodensatz klar abgegossen und mit Alkohol gefällt.

2,3277 gr. der bei 100° getrockneten Substanz hinterliessen 0,0024 gr. Asche = 0,103 %.

Auch jetzt gab die Asche deutliche Kalkreaction. Trotz des geringen Aschegehaltes besass das Präparat noch einen ziemlichen Schwefelgehalt.

2,3749 gr. Substanz gaben 0,1035 gr. BaSO_4 = 0,61 % S.

Ein Theil des nochmals mit Alkohol umgefällten Antipeptons wurde in Wasser gelöst und mit Zinkoxyd gekocht.

0,5733 gr. Substanz gaben 0,0684 gr. ZnO = 9,87 % Zn.

Durch eine oft wiederholte Alkoholreinigung konnte also ein Antipepton von sehr geringem Aschegehalt und in Versuch I von sehr geringem Schwefelgehalt gewonnen werden. Die so dargestellten Präparate lieferten Zinksalze, deren Zinkgehalt dem für fleischsaures Zink berechneten nahe kommt. Bei der Darstellung dieser Salze macht sich der Uebelstand geltend, dass auch bei Ausschliessung von Ammonsulfat das Antipepton zum Theil als Ammonsalz vorliegt, so dass zwar die wässerige Lösung Zinkcarbonat unter Aufbrausen auflöst, aber bei längerem Kochen unter Ammoniakentwicklung mehr auflöst. Dass dieses Antipepton zum Theil aus einem Ammoniaksalze bestand, ergibt sich daraus, dass verdünntes Barytwasser in der Kälte sofort Ammoniak entwickelt. Balke hatte mit denselben Schwierigkeiten zu kämpfen, er musste das Antipepton längere Zeit auf 90° erwärmen, um das Ammoniak zu entfernen. Ich habe die Versuche, durch Alkoholreinigung zu reinen Produkten zu gelangen, aufgegeben, da das (unreine) Antipepton sich bei sehr andauerndem Kochen mit Wasser unter fortwährender Ammoniakabspaltung zersetzt und es mir vorläufig unkontrollirbar erscheint, ob diese Zersetzung durch das (hypothetische) reine Antipepton oder durch Verunreinigungen hervorgerufen wird. Eine solche Zersetzung kann auch bei der langdauernden Alkoholreinigung stattfinden.

II. Versuche zur Reindarstellung des Antipectons durch Fällen von Eisenverbindungen in ammoniumsulfatgesättigten Lösungen.

Eine mit Kochsalz oder mit Ammonsulfat gesättigte Lösung von Rohantipepton oder von anhaltend mit Alkohol gereinigtem Antipecton gibt auf Zusatz von Ferrisalzlösungen, welche mit Kochsalz bzw. mit Ammonsulfat gesättigt sind, fast sofort einen voluminösen Niederschlag, der unter Umständen die ganze Lösung erstarren lässt.

Versuch I. Von dem oben (S. 340) beschriebenen, gereinigten Antipecton V wurde die wässrige Lösung mit Ammonsulfat unter Zusatz von einigen Tropfen Schwefelsäure heiss gesättigt, andern Tages abgesaugt und das Filtrat mit einer mit Ammonsulfat gesättigten Lösung von Eisenammoniakalaun versetzt. Der Niederschlag wurde nach mehreren Stunden abgesaugt, bis zum Verschwinden der Ferrireaction mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen, in Wasser suspendirt, mit Ammoniak vorübergehend gelöst und mit Barythydrat bis zur Ausfällung der Schwefelsäure versetzt. Aus dem Filtrate wurden die geringen Mengen überschüssigen Barytes durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat vom Baryumcarbonat eingedampft. Der Rückstand war bei Weitem nicht so hygroskopisch, als die nur mit Alkohol gereinigten Antipectonpräparate. Die wässrige Lösung des Rückstandes

- 1) reagirte sehr stark sauer;
- 2) gab sehr intensive Biuretreaction;
- 3) Millon's Reagens erzeugte eine weisse Fällung, die beim Kochen nicht roth, sondern nur hellbraun wurde;
- 4) Bleiessig gab in verdünnten Lösungen keinen, in concentrirten einen weissen, im Ueberschusse des Fällungsmittels löslichen Niederschlag;
- 5) Essigsäure und Ferrocyankalium riefen auch keine Trübung hervor;
- 6) Wenige Tropfen Pikrinsäure gaben keine Reaction: Zusatz von mehr Säure erzeugte eine Trübung, die beim Erwärmen verschwand, um beim Abkühlen wieder aufzutreten;

- 7) Gerbsäure und Essigsäure fällten einen Niederschlag;
- 8) Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure fällten nur in concentrirten Lösungen einen flockigen Niederschlag.
- 9) Sublimat gab eine schwache Trübung, allmählich Ausscheidung von Flocken;
- 10) Beim Kochen mit alkalischer Bleilösung entstand eine Braunfärbung.

Ein Theil wurde mit einem kleinen Ueberschusse mit Barythydrat auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Kohlensäure gesättigt, gekocht, filtrirt und eingedampft. Das Barytsalz löste sich klar in Wasser, reagierte stark alkalisch, die Lösung wurde nicht durch Kohlensäure getrübt.

0,3176 gr. bei 100° getrockneter Substanz gaben 0,1192 gr. BaSO_4
= 22,06% Ba.

Aus dem Barytsalze wurde durch Zinksulfat das Zinksalz dargestellt.

0,1736 gr. Substanz gaben 0,0280 gr. ZnO = 12,9% Zn.

(Für das Barytsalz der Fleischsäure berechnet sich Ba = 21,44%, für das Zinksalz 11,26% Zn). Wie ich weiter unten zeigen werde, bietet diese Methode der Eisenfällung in Verbindung mit der Alkoholmethode keine Sicherheit für die Reinheit des Produktes, immerhin ist es bemerkenswerth, dass sie ein Produkt von der ausgesprochenen Natur einer Säure liefert, welche Zink und Barytsalz von Metallwerthen, die denen der betreffenden Salze der Fleischsäure nahe kommen, geben. Da hier ein der langdauernden Alkoholbehandlung unterworfenen Präparat verwendet war, ist eine hierbei eingetretene Ammoniakabspaltung, wie oben ausgeführt, nicht ausgeschlossen.

Die Resultate, welche nach der Eisenmethode mit dem sorgfältig mit Alkohol gereinigten Antipectonpräparate erhalten waren, ermuthigten, die Methode auf ihre Anwendung bei Roh-antipecton zu prüfen. Zunächst fragte es sich, ob hierbei die Amidosäuren mit gefällt werden. Mit Asparaginsäure und Glutaminsäure lassen sich durch Eisenammoniakalaun in wässriger Lösung ebenfalls Niederschläge erzielen, dieselben lösen sich jedoch beim Zusatz von krystallisirtem Ammonsulfat auf. Die Lösung der Zersetzungsprodukte von 1 gr. Albumose durch

Salzsäure gab nach Sättigen mit Ammonsulfat bei schwach saurer Reaction auf Zusatz von ammoniumsulfatgesättigter Ferriammoniakalaunlösung keine Trübung. Erst andern Tages hatte sich eine Spur eines Niederschlages abgesetzt. Hingegen lieferte die Lösung der Zersetzungsprodukte von 100 gr. Casein durch Salzsäure unter denselben Umständen schon nach einiger Zeit eine Trübung, bei längerem Stehen einen Niederschlag. Derselbe war im Verhältniss zur Menge der einzelnen bekannten Spaltungsprodukte der Proteinkörper gering, aber bedeutend genug, um als eventuelle Verunreinigung des Antipeptonniederschlages in Betracht zu kommen. Nach der Entfernung des Eisens resultirt die Lösung einer oder mehrerer stickstoffhaltiger Substanzen, welche keine Biuretreaction geben. Ein ähnliches Produkt wurde aus Rohantipepton gewonnen. Der in ammoniumsulfatgesättigter Lösung gefällte Eisenniederschlag wurde haltend mit Wasser ausgekocht. Der Rückstand gab nach Zersetzung mit Ammoniak etc. einen Syrup, dessen Lösung keine Biuretreaction lieferte. Da diese Substanzen auch zum Theil in Wasser lösliche Eisenniederschläge bilden, ist eine Trennung durch Auskochen der Niederschläge nicht zu erzielen. Ich habe in dieser Richtung eine Anzahl Versuche ausgeführt. Die aus verschiedenen Rohantipeptonen dargestellten Eisenniederschläge wurden mit Wasser ausgekocht, die wässerigen Lösungen mit Ammoniak und Barythydrat behandelt, die Lösung der Säuren in verschiedenster Weise, bei saurer, neutraler, schwach ammoniakalischer Reaction, in wässriger und verdünnt alkoholischer Lösung mit Silbernitrat fractionirt gefällt. In den Silberanalysen wurde Ag, N, C und H bestimmt. Die Analysen der zahlreichen Silberfractionen und der aus den Silberanalysen dargestellten Säuren gaben theilweise sehr abweichende Werthe und zeigten deutlich, dass neben einer weniger Kohlenstoff als Eiweiss enthaltenden Substanz eine kohlenstoffreichere in die Eisenniederschläge geht. Nach meiner, vorläufig noch nicht fest begründeten Ansicht, enthalten die Eisenniederschläge, welche in ammoniumsulfatgesättigter Lösung gefällt werden, nicht die bekannten Basen und Amidosäuren, welche bei der pankreatischen Verdauung und Spaltung der Eiweisskörper durch Salzsäure entstehen. Wohl aber werden durch diese Reaction mehrere Körper, die

sich in der elementarischen Zusammensetzung dem Eiweiss nähern, gefällt. So lässt sich aus dem phosphatfreigemachten, mit Ammonsulfat gesättigten Harne ein starker Niederschlag mit ammonsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung fällen, aus dem eine oder mehrere Substanzen von Säurecharakter, die durch Mercurinitrat fällbar sind und keine Biuretreaction geben, erhalten werden. Die Untersuchung dieser Substanzen ist im hiesigen Laboratorium begonnen. Möglicher Weise gehören sie zur Classe der Uroprotsäure Cloetta's und Oxyproteinsäure Gottlieb's¹⁾ und Bondzynski's.²⁾

Nachdem die Versuche durch fractionirte Silberfällungen zu Produkten von constanter Zusammensetzung nicht zum Ziele führten, wurde Mercurinitrat als Trennungsmittel angewendet. Aus den in ammonsulfatgesättigter Lösung erhaltenen Eisenniederschlägen wurde das Säuregemenge dargestellt und die Lösung dieses mit Mercurinitrat ausgefällt. Die Quecksilberniederschläge wurden mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Filtrate vom Schwefelquecksilber nach Verjagen des Schwefelwasserstoffes durch Luft mit Ammoniak neutralisirt, eingengt, wieder die stark saure Flüssigkeit mit Am-

Anmerkung. Zur Zeit, als die Mittheilungen Cloetta's und Bondzynski's und Gottlieb's über die Uroprotsäure und Oxyproteinsäure erschienen, war ich mit Herrn C. Störmer bemüht, aus dem im phosphatfrei gemachten Harne durch Eisenchlorid entstehenden Niederschlag, der schon von Salkowski (Pflüger's Archiv Bd. 2 S. 351 und Bd. 16 S. 306; Landwehr) und Thudichum (Pflüger's Archiv Bd. 15 S. 455) untersucht worden ist, Substanzen von constanter Zusammensetzung zu isoliren. Das aus diesem Niederschlag erhaltene Substanzgemenge ist schwefelhaltig, der Eisenniederschlag enthält etwa 10% des Neutralschwefels des Harnes. Aus dem Substanzgemenge wurde durch fractionirte Fällung eine Reihe von Silbersalzen erhalten, die sich namentlich durch den Schwefelgehalt wesentlich unterschieden. Die aus den Silbersalzen dargestellten Säuren ähnelten im Verhalten und Zusammensetzung sehr der Uroprotsäure und Oxyproteinsäure. Es findet sich unter ihnen eine sehr schwefelreiche Substanz, da ein Silbersalz mit 50% Silbergehalt 3,23% Schwefel enthielt. Die Versuche zur Trennung dieser Säuren sollen jetzt unter Anwendung der Fällung in ammonsulfatgesättigter Lösung wieder aufgenommen werden.

1) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmac., Bd. XXXX, S. 29.

2) Centralblatt f. med. Wissensch., Bd. XXXV, S. 576.

moniak neutralisirt und mit Silbernitrat gefällt. Auch hier wurde sowohl die Quecksilberfällung als auch die Silberfällung in mehreren Versuchen fractionirt durchgeführt. Die Analysen der Silbersalze, der aus diesen dargestellten Säuren und Zinksalze lieferten zwar in einigen Fällen Werthe, welche mit denen für Fleischsäure und ihre Salze berechneten nahe übereinstimmten. Dieselben besitzen aber vorläufig keine Beweiskraft, da bei Parallelversuchen mit anderen Rohantipepton-Präparaten andere Resultate erhalten wurden. Die erhaltenen Antipepton-Präparate waren aschefrei, gaben starke Biuretreaction und enthielten vor der Behandlung mit Schwefelwasserstoff mit Ausnahme eines, das ganz schwefelfrei war, geringe Mengen Schwefel. Nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff war stets Schwefel nachweisbar. Beim Nachweis bzw. bei der Bestimmung des Schwefels wurde stets die Lösung der Schmelze mit Salzsäure wiederholt auf dem Wasserbade eingedampft. In dem einen Falle entstand dann in der Lösung der Schmelze durch Chlorbaryum auch beim langen Stehen kein Niederschlag. Hier fiel auch die Trockenprobe, welche trotz ihrer Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit nur wenig angewendet zu werden scheint, negativ aus.

Die Schwefel-Trockenprobe beruht bekanntlich darauf, dass schwefelhaltige organische Körper beim Verkohlen Schwefelwasserstoff entwickeln. Im Glühröhrchen wird eine sehr geringe Menge Substanz verkohlt, bei Gegenwart von Schwefel wird ein schmaler, zugespitzter, mit Bleiacetat benetzter Streifen Filterpapier geschwärzt bzw. gebräunt. Diese Probe zeigt den Schwefel keineswegs nur in solchen Substanzen an, welche beim Kochen mit alkalischer Bleilösung Schwefelblei bilden, sondern z. B. bei minimalen Mengen Oxyprotosulfonsäure, welche keinen bleischwärenden Schwefel enthält. Um einen Begriff von der Empfindlichkeit der Probe zu erhalten, habe ich auf einer Wage, die auf 0,01 mgr. empfindlich ist, von Witte's Pepton, das 0,93% S. enthielt, in einem Glühröhrchen 0,0012 gr., in einem anderen 0,0004 gr. abgewogen. Beide Proben färbten beim Verkohlen den Papierstreifen intensiv schwarz. Ferner wurden 2 gr. völlig schwefelfreier Stärke mit 0,1 gr. desselben Witte-Peptons sorgfältigst verrieben und gut durchschüttelt.

Von dieser Mischung lieferten 0,0011 gr. noch eine sehr deutliche Reaction. Es konnten also 0,0000005 gr. S. durch die Trockenprobe erkannt werden. Eine Täuschung bei dieser Probe ist höchstens dann möglich, wenn grössere Mengen Substanz benutzt werden, weil dann unter Umständen braune Destillationsprodukte, wie beim Zucker, den Papierstreifen bräunen.

Aus dem oben Mitgetheilten geht hervor, dass bei der tryptischen Verdauung aus dem Eiweiss ein Anti-pepton entsteht, welches durch Ammonsulfat nicht aussalzbar ist, eine starke Biuretreaction, nicht die Millon'sche gibt und schwefelfrei ist. Dasselbe ist bei Weitem nicht so hygroskopisch, als die nur mit der Alkoholmethode gereinigten Anti-pepton-Präparate. Es ist wahrscheinlich, dass das Anti-pepton den ausgeprägten Charakter einer Säure von derselben oder sehr ähnlichen Zusammensetzung wie die Fleischsäure besitzt.

Die weiteren Versuche zur Isolirung dieser Säure haben vorläufig ergeben, dass der Mercurinitratniederschlag, der aus der Eisenfällung in ammoniumsulfatgesättigter Lösung aus nicht anhaltend mit Alkohol gereinigtem Rohprodukt gewonnen wird, von gesättigter bezw. halbgesättigter Ammonsulfatlösung zum Theil gelöst wird. Die Analysen der Silbersalze zeigen, dass der ungelöste Theil relativ kohlenstoffreicher und stickstoffärmer als das aus dem Eisenniederschlage resultirende Gemenge ist.

Die mitgetheilten Methoden werden im hiesigen Laboratorium nach verschiedenen Richtungen angewandt, zur Untersuchung thierischer Flüssigkeiten und Extracte, sowie zum Studium der Zusammensetzung des bei der Pepsinverdauung entstehenden Amphopeptons. Die von Herrn Mühle begonnene Untersuchung hat bisher ergeben, dass das Amphopepton ein Gemenge mehrerer Substanzen ist, was mit den von Umber¹⁾ aus dem Hofmeister'schen Laboratorium mitgetheilten Beobachtungen im Einklange steht.

1) Diese Zeitschrift Bd. XV S. 258.

Ueber die quantitative Bestimmung des Harnindicans nach Wang-Obermayer.

Von

Jac. Bouma.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität in Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 8. Mai 1899.)

Nachdem im August 1898 die Arbeit von Wang¹⁾ über die quantitative Bestimmung des Harnindicans erschienen war, habe ich sofort nach diesem Verfahren viele Bestimmungen gemacht und bei verschiedenen Proben desselben Harnes gut übereinstimmende Resultate erhalten. Bei der Titrirung befolgte ich die Angabe Wang's, dass man als Endreaction nicht eine rothe, sondern eine schwach gelbliche Farbe der Titirlösung zu betrachten habe. Die Indicanmengen, berechnet als Indigotin, betrugen bei normalem menschlichen Harn ca. 5 mgr. pro Tag und stiegen in pathologischen Fällen öfters bis zu 18 mgr. Die Bestimmungen der gepaarten Schwefelsäure standen hiermit im Einklang, insofern als das Verhältniss zwischen Indoxylschwefelsäure und der totalen gepaarten Schwefelsäure, sowohl bei indicanreichem als auch bei indicanarmem Harn, ziemlich constant war. Bisweilen trat beim Eingiessen des mit Schwefelsäure behandelten Indigos in Wasser eine missfarbene Titirlösung auf, doch in weitaus den meisten Fällen eignete sich die erhaltene Lösung ganz gut zur Titration.

Als nun Obermayer²⁾ mittheilte, man sollte die röthlich-braunen Farbstoffe, die sich nach dem Verdunsten des Chloroforms als Belag auf das Indigoblau absetzen, mit 45%igem Alkohol ausziehen und dann das reine Indigoblau als Disulfo-

1) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 406.

2) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 427 und Wiener klin. Rundschau 1898, Nr. 34, S. 1.

säure zur Titration bringen, habe ich vergleichende Versuche nach beiden Methoden gemacht und bei Benutzung desselben Harns ganz verschiedene Resultate erhalten. Das eine Mal waren die Quantitäten Indigotin nach beiden Methoden annähernd gleich, ein anderes Mal war ein beträchtlicher Unterschied vorhanden. Durchschnittlich fand ich nach Obermayer 20% Indigotin weniger als nach Wang. Dieser Unterschied kam natürlich daher, dass ich nach Wang auch die röthliche Farbe mit Kaliumpermanganat zum Schwund brachte.

Neuerdings erschien eine andere Mittheilung von Wang,¹⁾ worin er zur Auswaschung der röthlichen Farbstoffe ein besseres Mittel empfahl, eine Mischung von Aetheralkohol und Wasser zu gleichen Theilen.

Nach dieser Behandlung bringt man nun wirklich eine prachtvolle, rein blaue Indigotindisulfosäurelösung zur Titration, jedoch wird die Menge des Indigotins, wie auch Wang selbst mittheilt, hierdurch weiter um ca. 10% herabgesetzt, so dass mit den ersten 20% (Waschung nach Obermayer) ein Gesamtverlust von etwa 30% entsteht. Wang's Waschungs-methode ergibt also titrimetrisch durchschnittlich 30% weniger Indigotin als sein ursprüngliches Verfahren.

Bei diesen sogenannten Reinigungen hat man nun aber die gelösten Farbstoffe (von Wang kurzweg Verunreinigungen genannt) einfach entfernt, ohne sich zu fragen, was sie eigentlich sind oder was sie mit der Indicanbestimmung zu thun haben können. Anfangs habe ich mir die Sache so vorgestellt, es werde sich bei der Behandlung des Chloroformrückstandes mit Schwefelsäure ein Theil des Indigotins in die Monosulfosäure (die purpurrothe Phoenicinschwefelsäure) umbilden. Da jedoch in den meisten Fällen nach dem Verdunsten des Chloroforms die rothen Farbstoffe sich deutlich auf die blauen absetzten, bevor die Behandlung mit Schwefelsäure geschah, musste ich hiervon absehen. Wir werden es hier vielmehr mit einer theilweisen Umbildung des Indoxyls in Indigo-roth und Indigo-braun zu thun haben. Bekanntlich wird auch bei der Bereitung von

1) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 135.

Indigotin aus Pflanzenindican neben dem Indigoblau immer eine gewisse Quantität Indigoroth und Indigobraun gebildet, bei der Ammoniakmethode sogar bis zu 14⁰/. Da nun der Mutterstoff des Indigo im Pflanzenindican Indoxyl in der Form eines Glucosids, im Harnindican Indoxyl in der Form eines Schwefelsäureesters ist, da ferner bei beiden zuerst das Molekül einer hydrolytischen Spaltung unterworfen wird, worauf bei beiden die Oxydation des Indoxyls zu Indigo erfolgt, so wird es nichts Aussergewöhnliches sein, dass bei beiden Processen ähnliche Körper gebildet werden. Ich glaube dies um so eher, als ich in demselben Harn bei gleicher Behandlung bald mehr, bald weniger Rothbildung fand. So erklären sich auch die Differenzen, die ich beim Vergleich von Wang's erster Methode und der von Obermayer (Waschung mit 45⁰/%igem Alkohol) erhielt. Es handelt sich hier also nicht um Skatol- oder andere Farbstoffe, sondern um Modificationen des Indigos. Da diese nun in fortwährend wechselnden Quantitäten, bis zu 30⁰/, gebildet werden, so muss man sie bei der Indicanbestimmung ganz genau mitberechnen. Zunächst muss aber bewiesen werden, dass der rothbraune Belag des Chloroformrückstandes wirklich Indigofarbstoffe sind, da das bisher Erwähnte nur Hypothese ist.

Bevor es mir gelang, die völlige Trennung der verschiedenen Indigofarbstoffe zu bewerkstelligen, habe ich nur auf Roth und Blau reagirt. Mir bekannte Reactionen auf Mischungen von Indigoroth und blau waren folgende:

Indigoroth ist löslich in Aether, Alkohol und Chloroform, während Indigoblau nur in Chloroform löslich ist.

Löst man eine Mischung von Indigoroth und Indigoblau auf dem Wasserbade in Eisessig und lässt danach ruhig abkühlen und spontan verdunsten, dann setzt sich das Blau auf dem Boden der Schale ab, während das Roth in Lösung bleibt.

Titirt man eine Mischung von Indigoroth und -blau als Disulfosäuren mit Kaliumpermanganat, dann wird das Blau sofort entfärbt, während das Roth nur sehr langsam oxydirt wird. Nach dem Verschwinden der blauen Farbe der Titirlösung tritt also die rothe auf, die langsam schwindet.

Diese drei Reactionen stimmen vollkommen überein mit dem Verhalten des aus Harn erhaltenen Chloroformrückstandes bei der Untersuchung nach dem ursprünglichen Verfahren von Wang.

Bis jetzt hatte ich Roth und Blau nur mittelst kalten Alkohols von einander getrennt und daher vom Indigobraun keine Spur entdeckt. Nur wies die rothbraune Farbe des Alkoholextractes und des Belags des Chloroformrückstandes auf die Anwesenheit des Braun neben dem Roth hin, und alle Autoren sprechen daher immer von rothbraunen Farbstoffen. Als ich nun den Rückstand vorsichtig mit Aether übergoss, löste sich darin das Indigoroth mit der ihm eigenen schönen purpurrothen Farbe, während auf dem Indigoblau ein brauner Belag blieb. Dieser Belag löste sich in kaltem Alkohol mit schöner kaffeebrauner Farbe, worauf das reine Blau auf dem Boden der Schale zurückblieb, das sich nun mit rein blauer Farbe in Chloroform löste. Diese Trennung der aus Harn erhaltenen Farbstoffe in Roth, Braun und Blau ist sehr scharf, und man erhält schöne, reinfarbige, klare Lösungen, die zur spectroscopischen Untersuchung geeignet sind.

Hierbei fand ich, dass die Spectra der von mir aus Harn erhaltenen Indigofarbstoffe ganz übereinstimmen mit denen von reinem Pflanzenindigoroth, -braun und -blau.

Die pflanzlichen Indigofarbstoffe habe ich aus käuflichem Indigo nach folgendem Verfahren erhalten: Indigo wird mit verdünnter Schwefelsäure öfters längere Zeit gekocht, bis das Filtrat nahezu farblos ist, und der Rückstand mit Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat keinen Niederschlag mit Baryumchlorid mehr gibt. Der Indigo ist dann von den humusartigen Bestandtheilen und vom Indigoleim befreit, während er von verdünnter Säure nicht angegriffen wird. Der Rückstand wird jetzt mit Chloroform in einem Kolben mit Rückflusskühler gekocht und die erhaltene Lösung in einer Schale verdunstet, wobei sich nun nacheinander Blau, Braun und Roth absetzen, wie bei den aus Harn erhaltenen Lösungen. Die verschiedenen Farben lassen sich dann auf bekannte Weise mit Aether, Alkohol und Chloroform trennen. Für spectroscopische

Zwecke ist dieses Verfahren um so mehr zu empfehlen, da man reines Indigoroth erhält, denn das Braun bildet eine schützende Decke über dem Blau, welch letzteres spurweise in Aether löslich ist, während das Indigobraun darin absolut unlöslich ist. Nach anderen Methoden löst man im Aether immer eine Spur Blau auf, wodurch die purpurrothe Farbe einen Stich ins Violette bekommt; solche Lösungen zeigen spectroscopisch immer eine Andeutung von Indigoblaustreifen links von D. Auf die genannte Weise bekommt man aber die reinen Lösungen der drei pflanzlichen Indigofarbstoffe zur spectroscopischen Untersuchung.

Was nun die Spectra dieser Lösungen betrifft, so habe ich schon erwähnt, dass die der Pflanzen- und der Harnindigofarbstoffe vollkommen identisch sind. Beide Indigoblaulösungen in Chloroform zeigen einen breiten Absorptionsstreifen zwischen d und D: der Streifen setzt mit 630 ziemlich scharf ein, läuft über D weg, nimmt von 590 bis 570 langsam ab und besitzt seine grösste Intensität bei 605. Beide Indigobraunlösungen in Alkohol zeigen gar keine Absorptionsstreifen; sie verdunkeln nur das ganze Spectrum. Beide Indigorothlösungen in Aether zeigen in verdünntem Zustande einen Absorptionsstreifen in gelbgrün, anfangend zwischen D und E bei 560, der über E abklingend wegzieht. Bei etwas stärkeren Lösungen fängt die Absorption kurz hinter D an und das ganze Grün wird bis hinter F absorbirt; ausserdem ist das ganze übrige violette Ende des Spectrums etwas verdunkelt. Bei ziemlich concentrirten Lösungen fängt die Absorption bei D scharf an und läuft bis kurz an G (bis ungefähr 450), während jetzt auch das ganze violette Ende des Spectrums sehr verdunkelt ist.

Ausser diesen genannten Uebereinstimmungen zwischen Pflanzen- und Harnindigofarbstoffen muss noch erwähnt werden, dass beide Indigobraunarten löslich sind in verdünnter Kali- und Natronlauge, worin Roth und Blau unlöslich sind.

Die Variabilität der auftretenden Mengen der Indigofarbstoffe aus Harn muss vielleicht auf Rechnung von Polymerie gesetzt werden. Die procentische Zusammensetzung der Indigomodificationen ist dieselbe, dagegen zeigen Löslichkeit und

Sublimationstemperatur ein ganz eigenthümliches Verhalten. Mit dem Abnehmen der Löslichkeit steigt die Sublimationstemperatur; erstere nimmt von Roth nach Blau ab, während letztere von Roth nach Blau steigt. Dieses Verhalten bei gleicher elementarer Zusammensetzung macht es nicht unwahrscheinlich, dass wir es hier mit Polymerie zu thun haben, wobei Roth das kleinste und Blau das grösste Indigomolekül haben soll. Es lässt sich auf diesem Wege das Auftreten der wechselnden Quantitäten der Indigomodificationen erklären, indem bei der Oxydation der befreiten Indoxylmoleküle zu Indigo die gebildeten Moleküle des letzteren auf verschiedenen Polymerisationsstufen stehen bleiben. Für Polymerie spricht auch die theilweise Umbildung von reinem Indigoblau in -roth bei Sublimation und bei Kochen der Chloroformlösung desselben. Auch die schnellere Oxydation der Indigoblaudisulfosäure gegenüber der Sulfosäure des Indigoroths mittelst Kaliumpermanganats steht hiermit im Einklang, indem beim Auseinanderfallen des grossen Indigoblaumoleküls wahrscheinlich viel Energie frei wird, die den Oxydationsprocess beschleunigen kann. Umgekehrt muss bei der Bildung des Indigos aus Indoxyl Energie in Form von Wärme zugeführt werden, wenn man ausschliesslich die höchste Polymerisationsstufe erlangen will. Die bei der Oxydation gebildete Wärme scheint dazu nicht zu genügen, und deshalb bleibt ein Theil auf niedriger Stufe stehen. Entzieht man also Energie durch Abkühlung, so hat man vorzugsweise Indigorothbildung zu erwarten.

Die Experimente stimmen hiermit vollkommen überein. Eine gewisse Quantität Harn wird mit Bleizuckerlösung gefällt und das klare Filtrat in drei gleiche Portionen getheilt.

Portion I wird in Eis auf 0° abgekühlt und danach ein gleich grosses Quantum Obermayer's Reagens tropfenweise zugegossen, sodass die Temperatur nicht über 3° steigt. Man lässt nun längere Zeit in Eis stehen, da die Oxydation bei 0° nur langsam von Statten geht. Portion II wird auf die gewohnte Weise bei Zimmertemperatur behandelt. Portion III wird 10–15 Minuten mit Obermayer's Reagens in einem Wasserbade von ungefähr 45° erwärmt; die Temperatur darf

50° nicht überschreiten, denn schon beim Siedepunkt von Chloroform scheint sich in Lösung befindliches Indigoblau wieder theilweise zu depolymerisiren zu Indigoroth. Erwärmt man kurze Zeit bei Siedehitze, dann wird hauptsächlich Roth gebildet; bei fortgesetztem Kochen wird alles zu höheren Stufen oxydirt und man bekommt keine Spur von Indigo beim Ausschütteln.

Die drei Portionen werden jetzt mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei man von Portion I eine rothviolette, von Portion II eine blauviolette und von Portion III eine rein blaue Chloroformlösung bekommt. Da ich öfters bemerkt hatte, dass während des Abdestillirens des Chloroforms bei Siedehitze desselben die blaue Farbe plötzlich einen Stich ins Violette zeigte, ja sogar ins Blauviolette umschlug, kam ich zu der schon erwähnten Hypothese der Depolymerisation und ich habe das Chloroform im Vacuum verdunstet. Spontane Verdunstung im Dunkeln ist auch zweckmässig, doch dauert sie recht lange.

Der Rückstand von Portion I zeigt sich nun auf der weissen Porzellanschale rothviolett, von Portion II blau mit rothbraunem Belag, von Portion III fast rein blau mit sehr geringer Rothfärbung. Durch Behandeln der Rückstände zuerst mit Aether und dann mit kaltem Alkohol werden nun successive Indigoroth und -braun gelöst. Wiewohl man hierbei bemerkt, dass bei Portion III die Bildung dieser Modificationen auf ein Minimum beschränkt ist, so muss ich doch gestehen, dass es mir niemals gelungen ist, allein reines Indigoblau darzustellen.

Die in den Schalen zurückbleibenden Mengen reinen Indigoblaus wurden nun als Disulfosäuren mit Kaliumpermanganat titirt, wobei sich ergab, dass für Portion I 3,15, für Portion II 6,55 und für Portion III 7,60 cem. zur Titration nöthig waren. Die Mengen des Indigoblaus sind natürlich diesen Zahlen proportional.

Diesen Versuch habe ich oft wiederholt, sowohl mit indicanreichem als mit indicanarmem Harn, und immer einen ähnlichen Befund, wenn auch mit etwas anderen Zahlen, constatiren können.

Nach allen diesen Erörterungen glaube ich, dass wir es

hier unzweifelhaft mit den Modificationen des Indigos zu thun haben, die sich nebeneinander bei der Oxydation des befreiten Indoxyls bilden. Es scheint mir also nicht richtig, bei der Bestimmung des Harnindicans nur auf das Indigoblau Acht zu geben, wie es Obermayer gethan, dem sich Wang in seiner letzten Mittheilung angeschlossen hat. Die rothen und braunen Farbstoffe, welche von diesen Autoren möglichst vollständig entfernt werden, sind nicht etwa vom Skatoxyl herstammende Verunreinigungen, sondern Oxydationsprodukte des Indoxyls. Es ist bis jetzt aber kein Mittel gefunden worden, das gestattet, die Oxydation des Indoxyls so verlaufen zu lassen, dass Blau, Braun und Roth in bestimmtem Verhältniss zu einander gebildet werden. Es ist deshalb nicht richtig, den mittelst Chloroform erhaltenen Indigo mit Alkohol oder Alkoholäther auszuwaschen. Beim Titriren der in Schwefelsäure gelösten Farbstoffe soll solange Kaliumpermanganat zugesetzt werden, als die Flüssigkeit noch eine Spur von einer rothen Farbe zeigt; Erwärmen beschleunigt die Titration des Roths. Solange die rothe Farbe bleibt, ist noch Indigorothdisulfosäure in Lösung; diese rothe Farbe kann nicht vom Kaliumpermanganat herkommen, da diese, auch wenn aller Indigo zu Isatin oxydirt ist, entfärbt wird, indem das Isatin weiter oxydirt wird zu farbloser Anthranilcarbonsäure.

Die Waschungsverfahren würden nur dann brauchbare Resultate liefern, wenn das Mengenverhältniss der auftretenden Modificationen immer constant wäre. Um mich von der Richtigkeit meiner Auffassung zu überzeugen, habe ich 6 Tage lang täglich $1\frac{1}{2}$ Liter normalen Menschenharn verarbeitet, wobei ich Wang's ursprüngliches Verfahren befolgte, um einen grösseren Mengenunterschied zwischen Totalindigo und reinem Indigoblau zu erzeugen. Ich erhielt daraus im Ganzen 30 mgr. Indigo, woraus nach Auswaschen mit Aetheralkohol 20 mgr. reines Blau resultirten. Die tägliche Titrirung desselben Harns ohne Waschung ergab ein mit 30 mgr. übereinstimmendes Quantum.

Utrecht, Mai 1899.

Die Beziehungen der Zusammensetzung der Asche des Säuglings zu derjenigen der Asche der Milch beim Meerschweinchen.

Von

Emil Abderhalden, cand. med.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Prof. G. v. Bunge in Basel.)

(Der Redaction zugegangen am 13. Mai 1899.)

Zur Prüfung der Frage nach den Beziehungen der Zusammensetzung der Asche des neugeborenen Meerschweinchens zu derjenigen der Asche der Milch derselben Species sammelte ich von vier Meerschweinchen, welche an ein und demselben Tage je 2 Junge geworfen hatten, vom Tage der Geburt an bis zum Eintritt der Verdoppelung des Anfangsgewichtes der Jungen täglich Milch. Dieselbe wurde bis zur Analyse auf dem Eise aufbewahrt. Mit dieser Arbeit verband ich zugleich eine Prüfung der von Herrn Prof. G. v. Bunge angegebenen Methode¹⁾ der Bestimmung aller Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere. Zu diesem Zwecke wurden folgende Analysen ausgeführt:

I. Bestimmung aller Aschenbestandtheile an einem neugeborenen Meerschweinchen. Dasselbe stammte aus dem am 1. III. 1899 geborenen Wurf. Derselbe bestand aus 2 Jungen.

¹⁾ Ueber die Aufnahme des Eisens in den Organismus des Säuglings. Diese Zeitschrift, Bd. XIII, 1889, S. 404.

Das analysirte Thier hatte noch gar keine Nahrung zu sich genommen.

II. Bestimmung der Aschenbestandtheile an drei neugeborenen Meerschweinchen. Alle drei gehörten dem am 12.

III. 1899 geborenen Wurf an. Es hatte noch keine Nahrungsaufnahme stattgefunden.

III. Bestimmung der Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere, und zwar an einem der vier am 25. III. 1899 geworfenen Meerschweinchen.

IV. Bestimmung der Aschenbestandtheile an den drei anderen am 25. III. 1899 geworfenen Thieren. Sowohl diese drei als das unter III erwähnte, demselben Wurf angehörende Thier hatten noch keine Nahrung zu sich genommen zur Zeit ihrer Tödtung.

I. Aschenanalyse der Meerschweinchenmilch.

100 Gewichtstheile Milch enthalten:

K_2O	0,0754 gr.
Na_2O	0,0700 „
Cl	0,0999 „
Fe_2O_3	0,0013 „
CaO	0,2417 „
MgO	0,0241 „
P_2O_5	0,2880 „
Summe der Aschenbestandtheile	0,8004 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,0225 „
	<hr/> 0,7779 gr.

100 Gewichtstheile Asche enthalten:

K_2O	9,6926 gr.
Na_2O	3,9985 „
Cl	12,8421 „
Fe_2O_3	0,1671 „
CaO	31,0705 „
MgO	3,0980 „
P_2O_5	37,0224 „
Summe der Aschenbestandtheile	102,8912 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	2,8912 „
	<hr/> 100,0000 gr.

Analytische Belege:

20,0151 gr. Milch gaben	0,0809 gr. AgCl = 0,0200 gr. Cl = 0,0999 %
33,2582 „ „	0,0838 „ KCl + NaCl
daraus	0,1301 „ K_2PtCl_6
hieraus berechnet . . .	0,0397 „ KCl = 0,0251 gr. K_2O = 0,0754 %
und	0,0441 „ NaCl = 0,0233 „ Na_2O = 0,0700 %
50,1022 gr. Milch gaben	0,0015 „ Fe_2O_3 , P_2O_5
hieraus berechnet . . .	0,0007 „ P_2O_5
	0,0008 gr. Fe_2O_3 .
Durch Titration gefunden	0,0006 „ Fe_2O_3 .
Im Mittel:	0,0007 „ Fe_2O_3 = 0,0013 % .
50,1022 gr. Milch gaben	0,1211 „ CaO = 0,2417 %
50,1022 „ „	0,0338 „ $Mg_3P_2O_7$ = 0,0121 gr. MgO = 0,0241 %
und	0,0216 „ P_2O_5 .
50,1022 gr. Milch gaben	0,1909 „ $Mg_3P_2O_7$ = 0,1220 gr. P_2O_5 .
	Gesamtmphosphorsäure = 0,1443 gr. = 0,2880 % .

II. Aschenanalysen neugeborener Meerschweinchen.

A. Bestimmung aller Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere.

Die Methode der Bestimmung sämtlicher Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere findet sich ausführlich in der citirten Arbeit Bunge's beschrieben. Die Methode ist kurz folgende:

Das ganze Thier wird mit Baryt eingeeäschert. Bei den ausgeführten Analysen an Meerschweinchen wurde das zerstückelte Thier mit einer Lösung von 5 gr. BaO auf dem Dampfbade digerirt, eingedampft und im Trockenschranke längere Zeit getrocknet. Die noch kohlenhaltige Asche des Thieres wird dann mit heissem Wasser ausgezogen, der darin unlösliche Rückstand weiter geglüht, bis keine Spur von Kohle mehr sichtbar ist. Die Asche wird hierauf mit kalter Salpetersäure extrahirt, und das darin Unlösliche mit heisser Salzsäure aufgenommen.

Das wässrige und das salpetersaure Extract werden vereinigt und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Der salzsaure Auszug wird getrennt von den übrigen Extracten aufbewahrt und ebenfalls auf ein bestimmtes Volumen gebracht.

Der Kürze wegen bezeichne ich das vereinigte — wässrige + salpetersaure — Extract als Extract I und den letzteren, salzsauren Auszug als Extract II.

Analyse I.

Diese Analyse wurde an einem am 1. III. 1899 geborenen Thiere ausgeführt. Das Resultat derselben war folgendes:

Das neugeborene Meerschweinchen enthielt auf 100 gr. Körpergewicht:

K ₂ O	0,2884 gr.
Na ₂ O	0,2435 »
Cl	0,3193 »
Fe ₂ O ₃	0,0080 »
CaO	0,1307 »
MgO	0,1085 »
P ₂ O ₅	1,4828 »
Summe der Aschenbestandtheile .	3,5812 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0720 »
	<hr/> 3,5092 gr.

Auf 100 Gewichtstheile Asche kommen:

K ₂ O	8,2216 gr.
Na ₂ O	6,9373 »
Cl	9,0968 »
Fe ₂ O ₃	0,2279 »
CaO	32,2136 »
MgO	3,0911 »
P ₂ O ₅	42,2449 »
Summe der Aschenbestandtheile .	102,0332 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	2,0332 »
	<hr/> 100,0000 gr.

Analytische Belege.

Das Gewicht des Meerschweinchens betrug 50,10 gr. Das wässrige und salpetersaure Extract (Extract I) wurde auf 500,0 ccm. verdünnt. Das salzsaure Extract wurde auf 50,0 ccm. verdünnt.

100,0 ccm. des Extractes I wurden mit 10,0 ccm. des Extractes II vermischt, und dieses Gemisch in einer Porzellan-

schale bis fast zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, die Lösung mit Barytlösung bis zur Bildung des Häutchens versetzt, auf dem Wasserbade erwärmt und bei bedecktem Trichter heiss filtrirt. Aus dem Filtrat wurde dann das überschüssige Baryum mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat gefällt und im Uebrigen in der gewohnten Weise nach Entfernung etwa vorhandener Magnesia durch Oxalsäure die Summe der Chloralkalien bestimmt und darauf durch Platinchlorid die beiden Alkalien getrennt.

Es wurden erhalten:

0,0918 gr. $KCl + NaCl$

daraus 0,1500 gr. K_2PtCl_6

hieraus berechnet 0,0458 gr. $KCl = 0,0289$ gr. K_2O

und 0,0460 gr. $NaCl = 0,0244$ gr. Na_2O .

Dies ergibt auf das Gesamtextract berechnet:

0,1445 gr. $K_2O = 0,2884\%$ und 0,1220 gr. $Na_2O = 0,2435\%$.

Zur Chlorbestimmung wurden vom Extract I 50,0 ccm. verwendet. Diese ergaben 0,0650 gr. $AgCl = 0,0160$ gr. Cl .

Hieraus berechnet 0,1600 gr. Cl im Gesamtextract I = **0,3193%**.

Zur Bestimmung der übrigen Aschenbestandtheile wurden von Extract I 300,0 ccm. und von Extract II 30,0 ccm. verwendet. Der Baryt wurde aus dieser Mischung mit verdünnter Schwefelsäure gefällt und abfiltrirt. In dem Filtrat wurden in der üblichen Weise Eisen, Calcium, Magnesia und Phosphorsäure bestimmt.

Es wurden erhalten:

0,0051 gr. $Fe_2O_3 + P_2O_5$

daraus berechnet $\frac{0,0023}{0,0028}$ gr. P_2O_5

0,0028 gr. Fe_2O_3 .

Durch Titration gefunden 0,0022 gr. Fe_2O_3 . Im Mittel: 0,0025 gr. Fe_2O_3 . Daraus für das Gesamtextract berechnet 0,0041 gr. $Fe_2O_3 = 0,0080\%$. Ferner 0,3402 gr. $CaO = 0,5665$ gr. im Gesamtextract = **1,1807%**.

0,0911 gr. $Mg_2P_2O_7 = 0,0328$ gr. MgO . Für das Gesamtextract berechnet 0,0544 gr. $MgO = 0,1085\%$.

Aus 0,0911 gr. $Mg_2P_2O_7$ berechnet 0,0582 gr. Phosphorsäure.

Die Phosphorsäurebestimmung ergab 0,6041 gr. $Mg_2P_2O_7 = 0,3863$ gr. P_2O_5 .

Gesamtphosphorsäure = 0,4468 gr. = 0,7429 gr. im Gesamtextract = **1,4828%**.

Analyse II.

Diese Analyse wurde an dem am 25. III. 1899 geworfenen Meerschweinchen ausgeführt. Dasselbe wog 51,00 gr.

Das neugeborene Meerschweinchen enthielt in 100 gr. Körpergewicht:

K ₂ O	0,2843 gr.
Na ₂ O	0,2411 „
Cl	0,3176 „
Fe ₂ O ₃	0,0084 „
CaO	1,1215 „
MgO	0,1174 „
P ₂ O ₅	1,4666 „
Summe der Aschenbestandtheile .	3,5569 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0716 „
	<hr/> 3,4853 gr.

100 Gewichtstheile Asche enthalten:

K ₂ O	8,1565 gr.
Na ₂ O	6,9171 „
Cl	9,1119 „
Fe ₂ O ₃	0,2409 „
CaO	32,1758 „
MgO	3,3682 „
P ₂ O ₅	42,0667 „
Summe der Aschenbestandtheile .	102,0371 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	2,0371 „
	<hr/> 100,0000 gr.

Analytische Belege.

Das vereinigte wässrige und salpetersaure Extract wurde auf 500,0 ccm. verdünnt. Das salzsaure Extract umfasste 50,0 ccm.

Alkalibestimmung.

100,0 ccm. des Extractes I. mit 10,0 ccm. des Extractes II vermischt, enthielten:

0,0925 gr. KCl + NaCl
daraus 0,1508 gr. K₂PtCl₆
hieraus berechnet 0,0460 gr. KCl = 0,0290 gr. K₂O
und 0,0465 gr. NaCl = 0,0246 gr. Na₂O

Auf das Gesamtextract berechnet: 0,1450 gr. K₂O = 0,2843%
und 0,1230 gr. Na₂O = 0,2411%.

Chlorbestimmung.

50,0 ccm. des Extractes I enthielten:

0,0659 gr. AgCl = 0,0162 gr. Cl.

Hieraus berechnet 0,1620 gr. Cl im Gesamtextract = 0,3176%.

Bestimmung des Eisens, des Calciums, Magnesiums und der Phosphorsäure.

In 300,0 ccm. des Extractes I + 30,0 ccm. des Extractes II waren enthalten:

	0,0053 gr. Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet	<u>0,0024</u> „ P_2O_5
	0,0029 gr. Fe_2O_3 .

Durch Titration gefunden 0,0023 gr. Fe_2O_3 . Im Mittel 0,0026 gr. Fe_2O_3 . Daraus berechnet für das Gesamtextract: 0,0043 gr. Fe_2O_3 = 0,0084%.

0,3422 gr. CaO = 0,5720 gr. im Gesamtextract = 1,1215%.

0,0998 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,0359 gr. MgO = 0,0599 gr. MgO für das Gesamtextract berechnet = 0,1174%.

Aus 0,0935 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, berechnet 0,0638 gr. P_2O_5 .

Die Phosphorsäurebestimmung ergab 0,6001 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,3838 gr. P_2O_5 .

Gesamtphosphorsäure 0,4500 gr. = 0,7480 gr. P_2O_5 im Gesamtextract = 1,4666%.

B. Bestimmung der Aschenbestandtheile an je drei Meerschweinchen.

Analyse I.

Die zu dieser Analyse verwendeten Meerschweinchen stammten sämmtlich aus dem am 12. III. geborenen Wurf.

Die Analyse ergab folgendes Resultat:

Auf 100 gr. Körpergewicht der neugeborenen Meerschweinchen kommen:

K_2O	0,2837 gr.
Na_2O	0,2364 „
Cl	0,3578 „
Fe_2O_3	0,0088 „
CaO	1,1796 „
MgO	0,1301 „
P_2O_5	<u>1,4660 „</u>
Summe der Aschenbestandtheile	3,6624 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	<u>0,0807 „</u>
	3,5817 gr.

100 Gewichtstheile Asche enthalten:

K ₂ O	7,9209 gr.
Na ₂ O	6,6002 „
Cl	9,9897 „
Fe ₂ O ₃	0,2456 „
CaO	32,9344 „
MgO	3,6323 „
P ₂ O ₅	40,9307 „
Summe der Aschenbestandtheile .	102,2538 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	2,2538 „
	<hr/> 100,0000 gr.

Analytische Belege.

Alkalibestimmung.

Das zur Alkalibestimmung verwendete Meerschweinchen wog **48,50** gr.
 Es wurden erhalten 0,4342 gr. KCl + NaCl
 daraus 0,7132 „ K₂PtCl₆
 daraus berechnet . 0,2179 „ KCl = 0,1376 gr. K₂O = **0,2837** %.
 und 0,2163 „ NaCl = 0,1147 „ Na₂O = **0,2361** %.

Chlorbestimmung.

Das zur Chlorbestimmung verwendete Thier wog **40,05** gr. Die Bestimmung ergab: 0,5799 gr. AgCl = 0,1433 gr. Cl = **0,3578** %.

Bestimmung des Eisens, Calciums, Magnesiums und der Phosphorsäure.

Das Gewicht des zu diesen Bestimmungen verwendeten Thieres betrug **50,10** gr. Die Analyse ergab: 0,0086 gr. Fe₂O₃. P₂O₅
 daraus berechnet . 0,0040 „ P₂O₅

0,0046 gr. Fe₂O₃.

Durch Titration gefunden . . . 0,0043 gr. Fe₂O₃.

Im Mittel 0,0045 gr. Fe₂O₃. = **0,0088** %.

0,5910 gr. CaO = **1,1796** %.

0,1812 „ Mg₂P₂O₇ = 0,0652 gr. MgO = **0,1301** % und 0,1158 gr. P₂O₅.

0,9612 „ Mg₂P₂O₇ = 0,6147 „ P₂O₅.

Gesammtphosphorsäure = 0,7345 gr. = **1,4660** %.

Analyse II.

Die drei zur Ausführung dieser Aschenanalyse verwendeten Thiere entstammten dem am 25. III. 1899 geborenen Wurf.

Die Analyse ergab folgende Resultate:

Auf 100 gr. Körpergewicht der neugeborenen Meerschweinchen kommen:

K ₂ O	0,2867 gr.
Na ₂ O	0,2380 »
Cl	0,3424 »
Fe ₂ O ₃	0,0084 »
CaO	1,1338 »
MgO	0,1302 »
P ₂ O ₅	1,4876 »
Summe der Aschenbestandtheile .	3,6271 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0772 »
	<hr/> 3,5499 gr.

100 Gewichtstheile Asche enthalten:

K ₂ O	8,0763 gr.
Na ₂ O	6,7044 »
Cl	9,6454 »
Fe ₂ O ₃	0,2366 »
CaO	31,9391 »
MgO	3,6677 »
P ₂ O ₅	41,9056 »
Summe der Aschenbestandtheile .	102,1751 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	2,1751 »
	<hr/> 100,0000 gr.

Analytische Belege.

Alkalibestimmung.

Das zur Alkalibestimmung verwendete Thier wog **47,85** gr. Die Analyse ergab . . . 0,4320 gr. KCl + NaCl
 hieraus 0,7112 » K₂PtCl₆
 daraus berechnet . . 0,2173 » KCl = 0,1372 gr. K₂O = **0,2867** %
 und 0,2147 » NaCl = 0,1139 » Na₂O = **0,2380** %.

Chlorbestimmung.

Das zur Chlorbestimmung verwendete Thier wog **41,50** gr. Die Analyse ergab 0,5750 gr. AgCl = 0,1421 gr. Cl = **0,3424** %.

Bestimmung des Eisens, des Calciums, Magnesiums und der Phosphorsäure.

Zu diesen Bestimmungen wurde das **49,69** gr. schwere Thier genommen. Die Analyse ergab 0,0082 gr. Fe₂O₃, P₂O₅
 daraus berechnet 0,0038 » P₂O₅ 0,0044 gr. Fe₂O₃.

Durch Titration erhalten 0,0040 gr. Fe_2O_3 .
 Im Mittel 0,0042 $\times \text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0084\%$
 0,5634 gr. $\text{CaO} = 1,1338\%$.
 0,1796 $\times \text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0647$ gr. $\text{MgO} = 0,1302\%$
 und 0,1148 $\times \text{P}_2\text{O}_5$.
 0,9703 $\times \text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,6206$ gr. P_2O_5 .
 Gesammtphosphorsäure = 0,7392 gr. = 1,4876%.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Resultate der Aschenanalysen der Milch und des Körpers der Meerschweinchen.

100 Theile Asche enthalten:	Neu- geborenes Meer- schweinchen Analyse A I	Neu- geborenes Meer- schweinchen Analyse B I	Neu- geborenes Meer- schweinchen Analyse A II	Neu- geborenes Meer- schweinchen Analyse B II	Meer- schweinchen- milch
K_2O	8,2216	7,9209	8,1565	8,0763	9,6926
Na_2O	6,9373	6,6002	6,9171	6,7044	8,9985
Cl	9,0968	9,9897	9,1119	9,6454	12,8421
Fe_2O_3	0,2279	0,2456	0,2409	0,2366	0,1671
CaO	32,2136	32,9344	32,1758	31,9391	31,0705
MgO	3,0911	3,6323	3,3682	3,6677	3,0980
P_2O_5	42,2449	40,9307	42,0667	41,9056	37,0224
Summe der Aschen- bestandtheile	102,0332	102,2538	102,0371	102,1751	102,8912
Sauerstoffäqui- valent des Chlors	2,0332	2,2538	2,0371	2,1751	2,8912
	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000

Die vorliegende Tabelle zeigt in erster Linie, dass die von Bunge beschriebene Methode der Bestimmung aller Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere genaue Resultate liefert. Die Uebereinstimmung der durch die Bestimmung aller Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere erhaltenen

Resultate mit den durch die getrennte Analyse gefundenen ist besonders bei Analyse A II und B II sehr genau. Beide Analysen wurden an Thieren aus ein und demselben Wurf ausgeführt. Eine Ausnahme macht nur die Chlorbestimmung. Diese ergab bei der Bestimmung aller Aschenbestandtheile an ein und demselben Thiere einen etwas niedrigeren Werth als bei der getrennt ausgeführten Aschenanalyse.

Ferner zeigt die Tabelle bei einer Vergleichung der Resultate der Thieranalysen mit derjenigen der Milch, dass auch hier beim Meerschweinchen zwischen der Zusammensetzung der Asche des Säuglings und derjenigen der Milch der Mutter Uebereinstimmung herrscht. Dieses von Bunge aufgestellte und von ihm am Hunde¹⁾ und von mir am Kaninchen²⁾ erhärtete Gesetz gilt also auch für das Meerschweinchen. Leider existirt vom Meerschweinchen noch keine Blutanalyse. Nach Analogie der Zusammensetzung des Blutserums der von mir untersuchten Blutarten³⁾ darf wohl geschlossen werden, dass die Zusammensetzung des Meerschweinchenblutserums nicht von den dort erhaltenen Resultaten abweicht. Ebenso wird die Zusammensetzung des Blutes des Meerschweinchens nicht allzusehr von derjenigen des Kaninchenblutes abweichen. Es ist deshalb wohl gestattet, auch hier den für die Deutung der Secretionsthätigkeit der Drüsenzellen so wichtigen Umstand als Thatsache zu erwähnen, dass nämlich die Zusammensetzung der Asche der Milch vollständig unabhängig ist von derjenigen des Blutes und des Blutserums.

Während die in der vorstehenden Tabelle durch Vergleichung der Zusammensetzung der Asche der Milch mit derjenigen des neugeborenen Thieres erhaltenen Resultate im Einklang stehen mit den beim Hunde und Kaninchen gewonnenen Befunden, tritt doch das Meerschweinchen in einem Punkte aus der Reihe

¹⁾ G. v. Bunge, Zeitschrift für Biologie. Bd. X, 1874, S. 295 und Du Bois Archiv 1886, S. 539.

²⁾ E. Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, Heft V, 1899, S. 498.

³⁾ E. Abderhalden, Zur quantitativen vergleichenden Analyse des Blutes. Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 100, 1898.

der genannten Thiere heraus. Diese Ausnahme wird bedingt durch das Verhalten des Eisens. Beim Hunde kommen auf 100 gr. Milchasche 0,12 gr. Eisenoxyd, auf 100 gr. Asche des Thierkörpers dagegen 0,72 gr.,¹⁾ beim Kaninchen entfallen auf erstere 0,08 gr. Fe_2O_3 , auf letztere 0,23 gr. Fe_2O_3 . Beim Meerschweinchen sind in 100 gr. Milchasche 0,17 gr. Fe_2O_3 , in 100 gr. Thierasche 0,24 gr. Fe_2O_3 enthalten. Während beim Hund und beim Kaninchen die Milch bedeutend weniger Eisen enthält, als der ganze Thierkörper, ist diese Differenz beim Meerschweinchen sehr gering. Es stimmt dieses Resultat vollständig mit den von Bunge gemachten Erfahrungen überein.²⁾ Bunge wies nach, dass das Meerschweinchen sich in Bezug auf seinen Eisengehalt anders verhält als die übrigen Thier-species, indem dasselbe bei der Geburt einen nur geringen Eisenvorrath besitzt.

1) Bunge, Diese Zeitschr., Bd. XIII, S. 401, 1889.

2) G. v. Bunge, Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 177, 1891 und Bd. XVII, S. 63, 1892. Vergl. auch G. v. Bunge, Lehrbuch der physiol. und pathol. Chemie, Aufl. IV, 1898, S. 411.

Nachtrag zu meiner Mittheilung über das Arginin.

Von
Wl. Gulewitsch.

(Der Redaction zugegangen am 22. Mai 1899.)

Die Vergleichung meiner im vorigen Heft dieser Zeitschrift erschienenen Untersuchungen mit den Arbeiten von E. Schulze und E. Steiger hat mich zu dem Schluss geführt, dass das von diesen Autoren aus Pflanzen gewonnene Arginin eine andere spezifische Drehung besitze wie das thierische. Ich hatte mich dabei auf folgende Angabe der Herren Schulze und Steiger bezogen: «Eine wässerige Lösung, welche in 20 ccm. 2,0 gr. Argininnitrat enthielt, drehte im Soleil-Ventzke'schen Polarisationsapparat im 200 mm.-Rohr $5,75^{\circ}$ nach rechts (bei 19° C.)».

Soeben theilt Herr Prof. E. Schulze brieflich Herrn Prof. A. Kossel mit, dass mit der Bezeichnung: « $5,75^{\circ}$ » nicht, wie ich es wohl voraussetzen berechtigt war,¹⁾ die aus der Ablesung berechneten Kreisgrade, sondern die unmittelbar abgelesenen Zahlen der Ventzke'schen Rohrzuckerskala zu verstehen sind. Wenn man aus diesen Zahlen die Werthe

1) Dieselbe Voraussetzung hat offenbar auch den Angaben über die spezifische Drehung des Arginins in «Landolt, Das optische Drehungsvermögen. II. Aufl., Braunschweig 1898, S. 584» zu Grunde gelegen. Hier finden sich unter Hinweis auf die Abhandlung der Herren Schulze und Steiger folgende Zahlen:

für Argininchlorhydrat $[\alpha]_D^{19} = + 33,1$

für Argininnitrat $[\alpha]_D^{19} = + 28,75$.

Demgemäss bedürfen auch diese Angaben der Berichtigung.

für $[\alpha]_D$ berechnet, so ergeben sich Werthe, welche mit den meinigen nahe übereinstimmen, nämlich für Argininnitrat ($c = 10\%$) $[\alpha]_D = + 9,95$ (ich habe für 10,206%ige Lösung gefunden: $+ 9,31$), für Argininchlorid ($c = 8\%$) $[\alpha]_D = + 11,45$ (nach meinen Beobachtungen ist für 9,579%ige Lösung $[\alpha]_D = + 10,70$).

Hierdurch fällt der Grund für die Annahme zweier rechtsdrehenden Arginine hinweg und die von mir genauer untersuchten optischen Verhältnisse gewinnen an Bedeutung für die quantitative Bestimmung des Arginins.

Ich möchte hinzufügen, dass nach einer brieflichen Mittheilung des Herrn Prof. A. Kossel auch das durch Trypsin gewonnene Arginin in seinem sauren Silbernitratsalz untersucht die gleiche Drehung ergab, wie ich sie für das durch Säurewirkung erhaltene beobachtet hatte, nämlich: $[\alpha]_D = + 5,48$; ich hatte gefunden: $[\alpha]_D = + 5,60$.

Paris, den 20. Mai 1899.

Ueber die quantitativen Beziehungen des Protagonis zum Nervenmark.

Von

A. Noll.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 13. Mai 1899.)

Es wäre für die Untersuchung des normalen wie krankhaft veränderten Nervensystems von Bedeutung, wenn das Nervenmark, welches einen hervorragenden Antheil an dem Aufbau des Nervengewebes nimmt, auch auf chemischem Wege genau bestimmt werden könnte. Man müsste dahin gelangen, mit exacten chemischen Methoden seine Mengenverhältnisse ziffernmässig auszudrücken und physiologische wie pathologische Vorgänge in ihm ihrem stofflichen Wesen nach zu ergründen. Auf diese Weise würde der anatomischen Untersuchung dieser Materie eine wesentliche Ergänzung zu Theil. Denn diese vermag nur über die Vertheilung des Nervenmarks im Ganzen und seine Bauverhältnisse im Einzelnen Aufschluss zu geben. Vor Allem da, wo sich bei degenerativen Vorgängen in ihm Formveränderungen mikroskopisch nachweisen lassen, ist ein Hand-in-Hand-gehen der anatomischen mit der chemischen Untersuchung unerlässlich.

Um diesem Ziele näher zu kommen, bietet das Protagon einen Angriffspunkt. Es ist durch die Untersuchungen nämlich, welche auf die Reindarstellung dieses Körpers abzielten, wahrscheinlich gemacht, dass das Protagon im Nervensystem nur dem Nervenmark zukommt, und zwar anscheinend in beträchtlicher Menge. Wenn diese Annahme richtig ist, so müssen Bestimmungen des Protagonis sich ohne Weiteres auf

das Nervenmark übertragen lassen. Eine Methode zur genauen quantitativen Bestimmung dieses Körpers existirt jedoch bis jetzt noch nicht. Baumstark¹⁾ hatte den Versuch gemacht, das Protagon neben den anderen Bestandtheilen des Nerven- gewebes an Gehirnen von Pferden zu bestimmen. Er berechnete es aus der Gewichtsabnahme, welche die mit kaltem Aether extrahirte und dann mit kaltem Alkohol behandelte Gehirn- masse nach Erschöpfung mit Alkohol bei 45° erfuhr. Genaue Resultate aber können auf diesem Wege, wie Baumstark selbst zugibt, nicht erreicht werden.

Ich versuchte deshalb in anderer Weise das Protagon quantitativ zu bestimmen und theile im Folgenden die Methode sowie einige mit ihr am Nervensystem angestellte Unter- suchungen mit.

Zuvor möchte ich ein Wort zu der Frage bemerken, in- wieweit das Protagon als ein chemisches Individuum zu be- trachten ist. Dass das Protagon kein Gemenge aus Lecithin und Cerebrin darstellt, wie es entgegen der ursprünglichen Auffassung Liebreich's von Diakonow²⁾ und Anderen be- trachtet worden war, ist durch die Untersuchungen Gamgee's und Blankenhorn's, Baumstark's, A. Kossel's und Frey- tag's und Ruppel's erwiesen. Man betrachtet demgemäss jetzt das Protagon als einen einheitlichen chemischen Körper, ohne indessen seine Constitution genau zu kennen. Er ist dadurch charakterisirt, dass man erst nach eingreifender Spaltung neben anderen Zersetzungsprodukten die Cerebroside: Cerebrin, Kerasin and Encephalin, aus ihm erhält.

Aber es ist durch A. Kossel und Freytag³⁾ in Frage

1) Baumstark, Ueber eine neue Methode, das Gehirn chemisch zu erforschen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 194.

2) Die Litteratur über diese Streitfrage findet sich ausführlich bei Ruppel: «Zur Kenntniss des Protagon». Zeitschr. f. Biologie Bd. XXXI, S. 86, zusammengestellt. Ich verweise auf dieselbe sowie bezüglich der Einwände Thudichum's auf dessen Schriften: Grundzüge der anatom. u. klin. Chemie, 1886 und: Ueber das Phrenosin. Journal f. prakt. Chem. N. F. 53, S. 49.

3) Kossel und Freytag, Ueber einige Bestandtheile des Nerven- marks. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XVII, S. 431.

gestellt worden, ob es nur ein Protagon gäbe. Denn die verschiedenen Autoren haben bei der Analyse ihrer Protagonpräparate etwas abweichende Zahlen erhalten, und vor Allem enthielten die Präparate Kossel's und Freytag's Schwefel, während Ruppel ein schwefelfreies Präparat analysirte. Es ist hierdurch wahrscheinlich gemacht, dass nicht nur ein Protagon von constanter elementarer Zusammensetzung existirt, sondern dass es deren mehrere gibt, so wie auch verschiedene Lecithine vorkommen. Und zwar könnte dies darauf zurückgeführt werden, dass jedesmal entweder nur das eine oder ein anderes der Cerebroside an dem Aufbau eines Protagon's theilnähme. Diese Möglichkeit muss bei den vorliegenden Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Es ist jedoch deshalb nicht die Beschränkung gegeben, dass die von mir erhaltenen Werthe, welche sich auf das meinen Untersuchungen zu Grunde gelegte Protagon beziehen, nicht ohne Kritik verallgemeinert werden dürften.

Methode der quantitativen Bestimmung des Protagon's.

Die Methode beruht darauf, das Protagon aus dem Reductionsvermögen der in ihm enthaltenen reducirenden Substanzen beim Kochen mit Fehling'scher Lösung zu bestimmen,¹⁾ analog dem Verfahren, welches zuerst von Fehling zur quantitativen Bestimmung der Zuckerarten eingeschlagen wurde. Dass man aus dem Protagon reducirende Substanzen in beträchtlicher Menge abspalten kann, war zuerst von Baeyer und Liebreich²⁾ bemerkt worden. Später vermochte Thierfelder³⁾ den aus dem Cerebrin zu gewinnenden reducirenden Körper als Galaktose zu erkennen. Dagegen ist die reducirende Atomgruppe, welche das Kerasin enthält, noch nicht unter-

¹⁾ Herr Dr. Ruppel hatte bereits früher in Fortsetzung seiner Untersuchungen über Protagon die Absicht, auf diese Weise das Protagon zu bestimmen, und auch damit bereits begonnen.

²⁾ Baeyer und Liebreich, Virchow's Archiv, Bd. XXXIX. S. 183 (1867).

³⁾ Thierfelder, Ueber die Identität des Gehirnzuckers mit Galaktose. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIV, S. 209.

sucht. Ob ferner nicht noch andere Atomcomplexe im Protagonmolekül vorhanden sind, welche zur Reduction Veranlassung geben, ist nicht bekannt. Eine genauere Kenntniss derselben war jedoch für den vorliegenden Zweck nicht nöthig.

Nach Analogie der Zuckerarten, deren Reductionsvermögen bei gleichen Kupfermengen von der Concentration der Zuckerlösung abhängt, war zu erwarten, dass auch das Reductionsvermögen des Protagon bei verschiedenen Mengen desselben unter sonst gleichen Verhältnissen ein verschiedenes sein würde. Es musste hierauf bei dem in Folgendem zu schildernden Verfahren Rücksicht genommen werden. Das Verhältniss von reducirtem Kupfer zu Protagon wurde in der Breite bestimmt, welche für die vorliegenden Untersuchungen erforderlich war. Das Protagonpräparat, welches zu diesen Bestimmungen diente, war zu dem Zwecke hergestellt und analysirt. Die bei der Analyse gefundenen Werthe werde ich zur Charakterisirung dieses Präparates unten mittheilen.

Die Spaltung des Protagon geschah mit siedender Salzsäure. Um während des Siedens eine Schädigung der einmal abgespaltenen reducirenden Produkte durch zu starke Säureconcentration zu verhüten, wurde die Salzsäure in möglichster Verdünnung angewandt. Es erwies sich eine Salzsäure von 0,75% Gehalt an HCl als stark genug, bei längstens 20 stündiger Einwirkung alle reducirenden Substanzen aus dem Protagon abzuspalten. Bei längerer Einwirkung der Säure bis zu 35 Stunden erhielt ich dieselbe Wirkung.

Mit dieser Salzsäure wurden 2 gr. des obengenannten Protagonpräparates zu einer dünnen Milch angerieben, in einem geräumigen Kolben am Rückflusskühler vorsichtig erhitzt und, um Schäumen des Inhalts zu vermeiden, allmählich ins Sieden gebracht. Nach 20 stündigem Sieden wurde das mit bräunlichen Flocken durchsetzte trübe Reactionsprodukt erkalten gelassen und mit einigen Cubikcentimetern einer kaltgesättigten Natriumsulfatlösung versetzt, wodurch ein leichteres Filtriren ermöglicht wird. Von dem Filtrat wurden vier verschiedene Antheile entsprechend 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 g Protagon auf ihr Reductionsvermögen geprüft. Zu dem Ende wurden die abgemessenen

Flüssigkeitsmengen auf 50 ccm. aufgefüllt, mit Natronlauge nicht vollständig neutralisirt und zum Sieden erhitzt. Zur siedenden Flüssigkeit wurden 30 ccm. einer siedenden Fehling'schen Lösung (34,65 g Kupfersulfat, 173 g Seignettesalz, 65 g Aetznatron im Liter enthaltend) hinzugefügt und das Ganze 2 Minuten lang gekocht. Die Erhitzung geschah in Soxhlet'schen Porzellanpfannen. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wurde hierauf auf einem Asbestfilter abgesaugt. Zur Bestimmung des Kupfers diente eine Methode, welche sich auf ein von Parkes angegebenes Verfahren gründete. Das Kupferoxydul wurde auf dem Filter in 15 ccm. Salpetersäure (1,40 sp. Gew.) gelöst, abgesaugt, die Lösung in ein geräumiges Titrigefäß gespült, mit 25 ccm. 25%iger Ammoniakflüssigkeit versetzt und auf 100 ccm. mit Wasser aufgefüllt. Nach dem Erkalten wurde die ammoniakalische Kupferoxydlösung mit einer Cyankaliumlösung bis zur Entfärbung titrirt. Letztere war aus käuflichem Cyankalium bereitet und so stark, dass 1 ccm. derselben 0,005—0,006 gr. Kupfer entsprach; sie war gegen eine Kupferlösung vorher eingestellt, welche im Liter 2 gr. chemisch reines Kupfer in 300 ccm. Salpetersäure (sp. Gew. 1,40) gelöst enthielt.¹⁾

So ergaben sich für

0,025 gr. Protagon	4,5 mgr. Kupfer
0,050 „ „	10,9 „ „
0,100 „ „	24,2 „ „
0,200 „ „	50,0 „ „

Trägt man diese Werthe für Protagon und Kupfer in ein Coordinatensystem ein, so entsprechen die gefundenen Punkte

¹⁾ Diese Methode der quantitativen Kupferbestimmung ist zuerst von Ulbricht (Beiträge zur Methode der Most- und Weinanalyse. Landwirthschaftliche Versuchsstation, Bd. 24) für die Bestimmung von Zucker verwandt worden, und es sind von ihm die Bedingungen genauer festgelegt worden, unter denen die Methode gute Resultate liefert. Ich muss dazu bemerken, dass ich, um genaue Resultate zu erlangen, den Kupferwerth meiner Cyankaliumlösungen für verschiedene Mengen Kupfer gesondert bestimmte, da ich denselben um so niedriger fand, gegen je geringere Kupfermengen ich die Cyankaliumlösung einstellte.

einer gleichmässig ansteigenden Linie; es war somit möglich, die zwischenliegenden Werthe durch Interpoliren zu finden.

Es genügte für die folgenden Untersuchungen, das Verhältniss von Kupfer zu Protagon bis zu 200 mgr. des letzteren zu ermitteln. Die kleine Tabelle, welche ich auf diese Weise erhielt und die den folgenden Berechnungen zu Grunde liegt, gebe ich nachstehend:

mgr. Kupfer	mgr. Prot.	mgr. Kupfer	mgr. Prot.	mgr. Kupfer	mgr. Prot.
5	27,5	20	84,4	35	141,9
6	31,3	21	88,3	36	146,0
7	35,1	22	92,0	37	149,8
8	39,0	23	95,8	38	153,5
9	42,6	24	99,7	39	157,4
10	46,4	25	103,5	40	161,3
11	50,3	26	107,3	41	165,2
12	54,2	27	111,1	42	169,1
13	58,0	28	115,0	43	172,8
14	61,6	29	118,7	44	176,6
15	65,5	30	122,6	45	180,5
16	69,4	31	126,6	46	184,4
17	73,1	32	130,4	47	188,3
18	76,9	33	134,3	48	192,2
19	81,7	34	138,1	49	196,1
				50	200,0

Das zu diesen Bestimmungen verwandte Protagonpräparat war aus Rückenmark des Ochsen dargestellt durch Extraction des von den Häuten befreiten und fein zerhackten Organs mit 80%igem Alkohol bei 45°. Das beim Erkalten der Alkohol-extracte ausgefallene Rohprodukt wurde gesammelt und gründlich mit kaltem Aether behandelt, danach wurde noch dreimal aus 80%igem Alkohol bei 45° umkrystallisirt, nachdem die einzelnen Fractionen jedesmal von Neuem mit Aether gereinigt waren.

Das so gewonnene Protagon wurde zur Analyse über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Die Verbrennungen geschahen mit Bleichromat unter Vorlegung reducirter Kupfer-spiralen. Der Stickstoff wurde nach Dumas-Zulkowsky bestimmt.

I. 0,1833 gr. Substanz gaben 0,4508 gr. CO_2 = 67,07% C und 0,1854 gr. H_2O = 11,24% H.

II. 0,1503 gr. Substanz gaben 0,3705 gr. CO_2 = 67,23% C und 0,1488 gr. H_2O = 11,00% H.

III. 0,2824 gr. Substanz gaben 6,2 ccm. N bei 756,5 mm. Bar. und 14° C. = 2,57% N.

IV. 0,5607 gr. Substanz gaben mit Soda und Salpeter geschmolzen 0,0232 gr. $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 1,156% P.

V. 0,5398 gr. Substanz gaben mit Soda und Salpeter geschmolzen 0,0250 gr. BaSO_4 = 0,654% S.

Die Resultate dieser Analysen stelle ich zum Vergleich mit denen früherer Autoren in folgender Tabelle zusammen.

	Lieb- reich ¹⁾	Gamgee und Blanken- horn ²⁾	Baum- stark ³⁾ (im Mittel)	Kossel und Freitag ⁴⁾	Ruppel ⁵⁾	Gule- witsch ⁶⁾	Meine Analysen
C.	66,74	66,39	66,48	66,25	66,29	—	67,15
H	11,74	10,69	11,12	11,13	10,75	—	11,12
N	2,80	2,39	2,35	3,25	2,32	2,11	2,57
P	1,23	1,068	1,02	0,97	1,13	1,062	1,156
S	—	—	—	0,51	0,096	0,70	0,654

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, dass das von mir analysirte Präparat bezüglich seines Stickstoff-, Wasserstoff- und Phosphorgehaltes unter die Mittelwerthe früherer Autoren eingereiht werden kann, während sein Kohlenstoffgehalt über dem Mittelwerth der anderen liegt. Die von Liebreich gefundenen Zahlen für den C-Gehalt seiner Präparate liegen zwischen 66,2 und 67,4%. Der von mir gefundene Werth entspricht also den höheren von Liebreich ermittelten. Der

¹⁾ Liebig's Annalen, Bd. 134, S. 32.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. III. S. 278.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX. S. 170.

⁴⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 438.

⁵⁾ Zeitschr. f. Biol. Bd. XXXI, S. 86.

⁶⁾ Gulewitsch, Ueber Cholin und Neurin. Moskau 1896 (russisch).

S-Gehalt meines Präparates liegt zwischen denen der Präparate Kossel's und Freytag's und Gulewitsch's.

Hieraus geht hervor, dass mein aus dem Rückenmark des Ochsen dargestelltes Protagon zu der Gruppe derjenigen Protagone gehört, welche bis jetzt aus Gehirn gewonnen wurden. Auch bezüglich seines Reduktionsvermögens stimmt es mit zwei Protagonpräparaten, welche aus Ochsenhirn stammten, überein. Diese entsprachen (für 100 mgr. Protagon) 24,18 resp. 23,80% Kupfer; mein Präparat, wie aus der oben angeführten Bestimmung zu ersehen ist, 24,20% Kupfer.

Man wird nach diesem Verfahren das Protagon überall da bestimmen können, wo sein Vorkommen durch seine Darstellung festgestellt ist. Jedoch ist dabei zu berücksichtigen, dass gleichzeitig vorhandene Körper, welche auf Fehling'sche Lösung reducirend wirken, bei den Bestimmungen ausgeschlossen sein müssen.

Quantitative Bestimmungen des Protagons im normalen Nervensystem.

Der wässrige Auszug der Gehirnssubstanz, welchen man in der noch zu beschreibenden Weise gewinnen kann, reducirt Fehling'sche Lösung beim Kochen nicht. Es muss dies vor Allem bemerkt werden, weil von Baldi¹⁾ das von Drechsel²⁾ aus der Leber gewonnene Jecorin auch aus menschlichem Rohcerebrin dargestellt worden ist und die wässrige Lösung dieses Körpers zu reduciren vermag. Auch nach Behandeln der frischen Gehirnmasse mit kaltem Alkohol vermochte ich aus dem Rückstand des letzteren zwar einen in Aether löslichen Körper zu gewinnen, welcher aus der ätherischen Lösung durch absoluten Alkohol fällbar war und in Wasser sich nicht ganz klar löste. Mit dieser entstand jedoch beim Kochen mit Fehling'scher Lösung unter den bei meinen Bestimmungen

1) Baldi: «Einige Bemerkungen über die Verbreitung des Jecorins im thierischen Organismus.» Du Bois' Archiv, 1887, Supplement, S. 100.

2) Drechsel: «Ueber einen neuen schwefel- und phosphorhaltigen Bestandtheil der Leber.» Journal f. prakt. Chemie, Bd. XXXIII, S. 425, N. F.

eingehaltenen Bedingungen keine Reduction des Kupferoxyds. Es kann demnach das von Baldi aus dem Rohcerebrin erhaltene Jecorin im frischen Gehirn sich nicht in solchen Mengen finden, welche bei diesen Untersuchungen gegenüber dem Protagon in Betracht kommen könnten. Da aus dem oben angeführten Grunde auch kein freier Zucker in irgendwie beachtenswerther Menge im frischen Gehirn vorhanden sein kann, so ist es ausgeschlossen, dass während der Behandlung des Gewebes mit Alkohol eine Lecithinzucker Verbindung entstehen möchte, wie sie von Bing¹⁾ beschrieben sind.

Dass bei Gegenwart von Lecithin und anderen alkohol-löslichen Substanzen des Nervengewebes neben dem Protagon dieses auch quantitativ nach dem eingeschlagenen Verfahren zu bestimmen ist, entschied ich durch folgende Probe. Ich stellte aus Ochsenrückenmark zwei genau gleiche Mengen heissen alkoholischen Extractes her, verdampfte den Alkohol und setzte der ersten Portion 1 gr. Protagon hinzu. Dann wurden beide Portionen für sich mit Salzsäure gespalten und die Kupfermengen bestimmt, welche den einzelnen Portionen entsprachen.

Die erste Portion ergab 0,5348 gr. Kupfer, die zweite 0,2856 gr. Kupfer. Die Differenz dieser beiden Zahlen zeigt die Kupfermenge an, welche auf das der ersten Portion zugegebene 1 gr. Protagon entfällt = 0,2492 gr. Kupfer, d. i. 24,92 % Kupfer, während das gleiche Protagonpräparat, unter gleichen Verhältnissen behandelt, 25,08 % Kupfer ergab.

Um die Methode zunächst am normalen Nervensystem zu prüfen, wählte ich verschiedene Theile desselben, welche durch mehr oder minder reichlichen Gehalt an markhaltigen Nervenfasern sich unterschieden. Es kamen zur Untersuchung reine weisse Substanz der Grosshirnhemisphären und des Rückenmarks, graue Substanz der Grosshirnrinde, ferner nuclei caudati, cauda equina und peripherer Nerv. Das Material entstammte lediglich ausgewachsenen Individuen, und zwar theils eben getödteten Thieren, theils menschlichen Leichen; das letztere

1) Bing: «Ueber das Jecorin». Vorläufige Mittheilung. Centralbl. f. Physiologie, 1898, Bd. XII, Nr. 7.

verdanke ich dem hiesigen pathologischen Institut, einiges erhielt ich von auswärts zugesandt.

Bei der Verarbeitung des Materials wurde eine Verunreinigung mit Blut nach Möglichkeit ausgeschlossen. Die weisse und graue Substanz, auf deren reine Gewinnung es vor Allem ankam, wurde durch flache Scheerenschnitte dem Organ entnommen, die *nuclei caudati* wurden im Ganzen aus dem Gehirn herausgeschält, die Nerven möglichst frei von Fett und Bindegewebe präparirt. Mit Ausnahme der letzteren wurde das so gewonnene Gewebe nach der Wägung sehr fein zerhackt und mit wenig Wasser zu einem dünnen Brei angerieben. Um das Wasser, welches durch die Waschlüssigkeit sich beträchtlich vermehrte, von dem Gewebe wieder zu trennen, fügte ich von einer 10%igen Magnesiumsulfat- oder Natriumsulfatlösung¹⁾ der gesammten Emulsion solange zu, bis die morphologischen Partikelchen in feinen Flocken sich abzusetzen begannen. Dasselbe erreicht man durch Zusatz verdünnter Mineralsäuren oder Essigsäure, auch durch Bleizuckerlösung, welche ja schon häufiger angewandt wurde, während Ammoniak und Natronlauge nicht zum Ziele führen. Um ein schnelles Absetzen zu erreichen, wurde die Masse centrifugirt, und so resultirte am Boden des Gefässes der zusammengepresste Gehirnbrei und darüber eine ziemlich klare Flüssigkeit, welche nun ein verdünntes wässeriges Extract der Masse darstellt. Dies Verfahren dürfte wohl am schnellsten und ohne den Nachtheil stärkerer chemischer Eingriffe zu einem Auszug der wasserlöslichen Bestandtheile des Nervengewebes führen. Nach Abgiessen der wässerigen Flüssigkeit wurde der Rückstand mit 95%igem Alkohol versetzt und mit diesem auf dem Wasserbade extrahirt. Solange beim Abkühlen des Alkohols von selbst etwas zur Ausscheidung gelangte, wurde das alkoholische Extract täglich abgesaugt, wenn dies nicht mehr der Fall war, wurde zur Extraction der letzten Antheile mehrere Tage hintereinander

¹⁾ Bei Liebreich (Liebig's Annalen, Bd. 134, S. 44) findet sich die Angabe, dass Hoppe-Seyler bereits Gehirnssubstanz mit Natriumsulfatlösung behandelt hat und so einen gut filtrirenden wässerigen Auszug gewann.

noch mit siedendem Benzol ausgezogen, bis eine Probe desselben beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterliess.

Zur Erschöpfung des Gewebes mit Alkohol und Benzol waren im Ganzen 8—10 Tage erforderlich.

Die Nerven wurden durch Zerschneiden mit der Scheere und nachheriges Zerzupfen zerkleinert, um dann direkt in Alkohol gebracht und in der eben beschriebenen Weise der Extraction mit Alkohol und Benzol unterworfen zu werden.

Die zweckmässiger Weise in Porzellanschalen gesammelten Auszüge wurden nach beendeter Extraction in denselben auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der Rückstand wurde mit 0,75%iger HCl angerieben und dann gespalten in der Weise, wie es oben für das Protagon beschrieben ist. Bei den in den einzelnen Bestimmungen verwandten Substanzmengen genügten jedes Mal höchstens 100 ccm. dieser Säure. Das Sieden unterbrach ich nach 30 Stunden, nachdem ich mich mehrmals überzeugt hatte, dass nach dieser Zeit die vollständige Abspaltung der reducirenden Substanzen aus dem Nervenmark gelungen ist. Das weitere Verfahren gestaltete sich so, wie es für das Protagon angegeben ist.

Um bei der Kupferbestimmung die gleichen Bedingungen, wie dort, zu befolgen, musste im einzelnen Falle das Filtrat so verdünnt werden, dass 50 ccm. desselben nicht mehr als 50 mgr. Kupfer entsprachen. Nach der für 50 ccm. gefundenen Kupfermenge wurde nach der oben wiedergegebenen Tabelle die Protagonmenge bestimmt. Aus mehreren solcher Bestimmungen wurde das Mittel genommen und hieraus die Protagonmenge für das gesammte Filtrat berechnet.

Da es zum genaueren Vergleich der einzelnen Bestimmungen untereinander wünschenswerth war, die ermittelten Protagonmengen auf die trockene Gewebssubstanz zu beziehen, so führte ich mit Ausnahme von zweien in allen Fällen gleichzeitig Trockenbestimmungen aus. Dazu wurde das Gewebe in gewogenen Porzellanschalen gewogen, bei 105—110° im Luftbade getrocknet bis zur Gewichtsconstanz, die so gefundene Gewichtsabnahme als Wasser berechnet. Da vielfach angegeben wird, dass bei dieser hohen Temperatur einige Gehirn-

stoffe eine Zersetzung erleiden und dadurch die Trockenbestimmungen ungenau ausfallen könnten, so bestimmte ich an weisser Substanz des Ochsenhirns vergleichsweise den Gewichtsverlust einmal bei 105° und ausserdem bei $65-70^{\circ}$ im Vacuum. Beide Male erhielt ich die gleiche Gewichtsabnahme.

I. 2,650 gr. der Substanz verloren bei 105° 1,845 gr. an Gewicht = 69,62%.

II. 3,858 gr. verloren bei $65-70^{\circ}$ im Vacuum 2,693% an Gewicht = 69,80%.

Im Folgenden gebe ich nun die Belege für die von mir ausgeführten Protagonbestimmungen im Einzelnen:

I. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären des Menschen (Meningitis). H_2O -Gehalt = 69,53%.

1. 10,685 gr. Substanz ergaben 0,6768 gr. Protagon, d. i. 6,33% der feuchten Substanz.

2. 8,302 gr. Substanz ergaben 0,5260 gr. Protagon, d. i. 6,33% der feuchten Substanz = 20,79% der trocknen weissen Substanz.

II. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären des Menschen (Sepsis). H_2O -Gehalt = 70,68%.

11,825 gr. Substanz ergaben 0,6732 gr. Protagon = 5,69% der feuchten Substanz = 19,42% der trocknen weissen Substanz.

III. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären des Menschen (Gliom des Stirnhirns). H_2O -Gehalt = 71,22%.

10,310 gr. Substanz ergaben 0,6380 gr. Protagon = 6,19% der feuchten Substanz = 21,50% der trocknen weissen Substanz.

IV. Weisse Substanz vom Rückenmark desselben Individuums (Nr. III). H_2O -Gehalt = 73,60%.

7,752 gr. Substanz ergaben 0,4530 gr. Protagon = 5,84% der feuchten Substanz = 22,13% der trocknen weissen Substanz.

V. Graue Substanz von den oberflächlichsten Theilen der Grosshirnrinde des Menschen (morb. Adison. H_2O -Gehalt = 84,44%.

19,162 gr. Substanz ergaben annähernd 0,0357 gr. Protagon = 0,186% der feuchten Substanz = 1,197% der trocknen grauen Substanz.

VI. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären vom Ochsen. H_2O -Gehalt nicht bestimmt.

22,80 gr. Substanz ergaben 1,3650 gr. Protagon = 5,98% der feuchten Substanz.

VII. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären vom Ochsen. H_2O -Gehalt = 69,01%.

10,038 gr. Substanz ergaben 0,6169 gr. Protagon = 6,14% der feuchten Substanz = 19,83% der trockenen weissen Substanz.

VIII. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären vom Ochsen. H_2O -Gehalt = 70,35%.

8,520 gr. Substanz ergaben 0,5405 gr. Protagon = 6,34% der feuchten Substanz = 21,39% der trockenen weissen Substanz.

IX. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären der Kuh. H_2O -Gehalt = 69,62%.

1. 5,555 gr. Substanz ergaben 0,3596 gr. Protagon = 6,47% der feuchten Substanz.

2. 3,710 gr. Substanz ergaben 0,2535 gr. Protagon = 6,83% der feuchten Substanz, im Mittel = 6,65% der feuchten Substanz = 21,89% der trockenen weissen Substanz.

X. Weisse Substanz vom Rückenmark des Ochsen. H_2O -Gehalt nicht bestimmt.

12,80 gr. Substanz ergaben 1,0596 gr. Protagon = 8,27% der feuchten Substanz.

XI. Weisse Substanz vom Rückenmark des Ochsen. H_2O -Gehalt = 64,17%.

1. 15,593 gr. Substanz ergaben 1,2700 gr. Protagon = 8,14% der feuchten Substanz.

2. 14,865 gr. Substanz ergaben 1,2130 gr. Protagon = 8,16% der feuchten Substanz, im Mittel = 8,15% der feuchten Substanz = 22,75% der trockenen weissen Substanz.

XII. Weisse Substanz vom Rückenmark des Ochsen. H_2O -Gehalt = 64,20%.

6,297 gr. Substanz ergaben 0,5640 gr. Protagon = 8,96% der feuchten Substanz = 25,02% der trockenen weissen Substanz.

XIII. Vier nuclei caudati aus 2 Gehirnen vom Ochsen. H_2O -Gehalt (an 2 nucl. caud. eines anderen Ochsenhirns bestimmt) = 80,20%.

11,50 gr. Substanz ergaben 0,1055 gr. Protagon = 0,917% der feuchten Substanz = 4,84% der trockenen Substanz.

XIV. Weisse Substanz aus den Grosshirnhemisphären vom Hund. H_2O -Gehalt = 69,02%.

2,920 gr. Substanz ergaben 0,1830 gr. Protagon = 6,27% der feuchten Substanz = 20,22% der trockenen weissen Substanz.

XV. Cauda equina zweier Ochsen. H_2O -Gehalt (bestimmt an der cauda equina eines anderen Ochsen) = 70,79%.

5,647 gr. Substanz ergaben 0,2056 gr. Protagon = 3,64% der feuchten Substanz = 12,46% des trockenen Gewebes.

XVI. Nervus ischiadicus vom Oberschenkel des Pferdes H_2O -Gehalt = 67,80%.

14,56 gr. Substanz ergaben 0,2056 gr. Protagon = 2,41% der feuchten Substanz = 7,47% des trockenen Gewebes.

Die Annahme, welche zunächst bestehen konnte, dass bei dem menschlichen Material der Protagonengehalt möglichenfalls von der stattgehabten Erkrankung des Individuums beeinflusst gewesen sei, hat sich, wie ein Durchgehen der Zahlen zeigt, nicht bestätigt. Es sind nämlich bei den menschlichen Gehirnen die Differenzen der einzelnen Bestimmungen der weissen Substanz untereinander nicht grösser, als bei dem nämlichen Gewebe vom Ochsen. Ferner musste berücksichtigt werden, dass die menschlichen Objecte nach wenigstens 24 Stunden nach erfolgtem exitus erst zur Verarbeitung kamen. Da es ohne Weiteres nicht sicher war, ob dieser Umstand nicht von Einfluss auf die Resultate sein könnte, so machte ich einen dahingehenden Versuch.

Zu dem Zweck liess ich von dem Ochsenhirn, dessen eine Grosshirnhemisphäre zur Bestimmung VII gedient hatte, die andere Hemisphäre sammt Hirnhäuten 3 Tage lang an der Luft liegen und führte an dieser dann gleichzeitig mit einer Trockenbestimmung eine Protagonbestimmung aus. Es ergaben sich 70,45% Gewichtsabnahme gegenüber 69,01% der anderen Hemisphäre und 18,98% Protagon, auf die trockene Substanz berechnet, gegenüber 19,83%. Es ist unwahrscheinlich, dass von vornherein im Wassergehalt beider Hemisphären eine Differenz von 1,44% bestanden hätte. Vielmehr ist anzunehmen, dass während des dreitägigen Liegens Veränderungen im Gewebe vor sich gegangen sind, in Folge deren etwa flüchtige Substanzen sich gebildet haben, die später beim Trocknen die Gewichtsabnahme vermehrten. Unter Zugrundelegung der jeweiligen Trockenbestimmung zur Zeit der Untersuchung haben sich bei diesem Versuch Zahlen für den Pro-

tagengehalt der verglichenen Theile ergeben, die nicht weit genug von einander abweichen, um aus ihnen schliessen zu können, dass selbst durch dreitägige Verzögerung in der Verarbeitung eines Gehirnes nennenswerthe Fehler bedingt werden.

Da ferner Theile des Nervensystems von gleicher Herkunft bei Thier und Mensch in den untersuchten Fällen keine grösseren Unterschiede aufweisen, als es zwischen verschiedenen Individuen derselben Art der Fall ist, so dürften sich die sämtlichen gefundenen Zahlen gleichwerthig untereinander ordnen lassen. In nachfolgender Tabelle sind sie deshalb ihrer Höhe nach in absteigender Reihe zur Uebersicht noch einmal zusammengestellt.

Nummer	Material	Herkunft	Protagonmenge	
			in % des feuchten Gewebes	in % des trockenen Gewebes
1.	Rückenmark, weisse Substanz	Ochs	8,27	—
2.	„ „ „	„	8,96	25,02
3.	„ „ „	„	8,15	22,75
4.	„ „ „	Mensch	5,84	22,13
5.	Gehirn, „ „	Kuh	6,65	21,89
6.	„ „ „	Mensch	6,19	21,50
7.	„ „ „	Ochs	6,34	21,39
8.	„ „ „	Mensch	6,33	20,79
9.	„ „ „	Hund	6,27	20,22
10.	„ „ „	Ochs	6,14	19,83
11.	„ „ „	Mensch	5,69	19,42
12.	„ „ „	Ochs	5,98	—
13.	Cauda equina	„	3,64	12,46
14.	Nerv. ischiadic.	Pferd	2,41	7,47
15.	Nucl. caudat.	Ochs	0,917	4,84
16.	Grosshirnrinde	Mensch	0,186	1,197

Ueberblicken wir die am besten untereinander vergleichbaren Zahlen der letzten Spalte dieser Zusammenstellung, so ergibt sich, dass die für die untersuchten Theile des Nerven-

Systems ermittelten Protagonmengen ihrem Gehalte an markhaltigen Nervenfasern entsprechen. Da, wo wir im Nervengewebe markhaltige Nervenfasern am dichtesten zusammengelagert finden, in der weissen Substanz der Centralorgane, ist die Protagonmenge am grössten. Sie verringert sich schon deutlich in den Nervenwurzeln des Rückenmarks, deren markhaltigen Elemente eine Vermischung mit Bindegewebe erfahren haben. Die Zunahme der bindegewebigen Elemente gegenüber den nervösen gibt sich weiterhin im peripheren Nerven in noch grösserem Maasse zu erkennen. Bei vornehmlich grauer Substanz, wie hier dem nucleus caudatus, der aber auch makroskopisch deutlich markhaltige Züge zu Tage treten lässt, ist wohl noch ein bemerkenswerther Protagongehalt vorhanden, derselbe erreicht aber kaum mehr den vierten Theil des der weissen Substanz. In der Hirnrinde endlich, welche natürlich mit markhaltigen Fasern mehr oder weniger stark durchsetzt isolirt wird, je tiefere oder oberflächlichere Schichten man von ihr nimmt, sonst immer Bestandtheile des Nervenmarks in sich schliessen muss, lassen sich mit unserer Methode nur noch Spuren von Protagon nachweisen.

Für diejenigen Theile, welche hier nur durch eine Bestimmung vertreten sind, besteht natürlich bezüglich Verallgemeinerung der gefundenen Zahlen eine gewisse Beschränkung. Sie genügen indessen für den vorliegenden Zweck, da sie nur im Ganzen die constante Beziehung zwischen Protagon und Nervenmark beweisen sollen. Bezüglich der reinen weissen Substanz dagegen lag das Interesse vor, eine grössere Anzahl von Bestimmungen zu machen, um aus ihnen zu sehen, inwieweit ein morphologisch ziemlich gleichmässig gefügtes Gewebe als solches sich auch chemisch zu erkennen gäbe. Nun zeigt unsere Zusammenstellung, dass die weisse Substanz des Rückenmarks etwas reicher an Protagon ist, als die des Gehirns. Immerhin sind die am Rückenmark gemachten Bestimmungen nicht zahlreich, aber es ist doch bemerkenswerth, dass die für die weisse Substanz dieses Organs gefundenen geringsten Protagonmengen noch grösser sind, als die höchsten der weissen Substanz des Gehirns. Sollte diese Erscheinung constant sein, so dürfte sie sich schwerlich ausbekannten anatomischen Ver-

hältnissen erklären lassen. Zunächst bleibt zu ihrer Erklärung die Möglichkeit offen, dass an dem Aufbau der Markscheide der Rückenmarksfasern das Protagion sich in hervorragenderer Weise theilnimmt, als an den gleichen Elementen des Gehirns.

Von dieser Differenz abgesehen, zeigen die 8 Protagionbestimmungen in der weissen Substanz der Grosshirnhemisphären eine Uebereinstimmung innerhalb einer Breite von $2\frac{1}{2}\%$. Demnach bestehen individuelle Schwankungen innerhalb mässig weiter Grenzen, während bei mehreren an demselben Gehirn ausgeführten Bestimmungen Differenzen in dieser Höhe an dem vorliegenden Material nicht aufgetreten sind. Somit dürfen wir auf Grund der von uns gewonnenen Resultate sagen, dass die weisse Substanz der Grosshirnhemisphären entsprechend ihrem überwiegenden Gehalt an markhaltigen Nervenfasern durch deren Protagiongehalt auch chemisch annähernd charakterisierbar ist. Im Mittel der hier gefundenen Werthe würde derselbe $20,72\%$ in Procenten der trockenen weissen Substanz unter Zugrundelegung eines Protagions von der oben gegebenen Zusammensetzung betragen.

Die hier mitgetheilten Untersuchungen hatten es sich zum Ziel gesetzt, einen bestimmten Bestandtheil der markhaltigen Nervenfasern im Hinblick auf deren anatomische Vertheilung quantitativ zu bestimmen. Ein direkter Vergleich unserer Resultate mit den seitherigen der quantitativen Nervenchemie, soweit sie sich auf die fettartigen Bestandtheile des Nervengewebes beziehen, ist deshalb nicht möglich, weil bis dahin die Bearbeiter dieses Stoffes ein anderes Vorgehen gewählt hatten. Die älteren Autoren, namentlich v. Bibra,¹⁾ zielten im Wesentlichen darauf hin, den gesammten Wassergehalt, « Fettgehalt » und Gehalt an festen Bestandtheilen in verschiedenen Partien des Gehirns und Rückenmarks beim Menschen sowohl wie beim Thier festzustellen. Ein vergleichender Werth bezüglich der Vertheilung der « Gehirnfette » im Gehirn wird diesen Untersuchungen bleiben, wenn es auch damals noch nicht möglich war, auf die näheren Bestandtheile derselben näher einzugehen.

1) v. Bibra: «Vergl. Unters. über d. Gehirn d. Menschen u. d. Wirbelthiere.» Mannheim 1854.

Erst unter Hoppe-Seyler's Leitung wurden ausführlichere quantitative Untersuchungen gemacht, so von Petrowsky¹⁾ an der grauen und weissen Substanz des Ochsenhirns und von Chevalier²⁾ am menschlichen nerv. ischiadicus. Aber da zur Zeit dieser Untersuchungen die Anschauungen über das Protagon noch nicht geklärt waren, wurde dieses noch gar nicht in Betracht gezogen. Vielmehr wurde der gesammte gefundene Phosphor der ätherischen und alkoholischen Auszüge auf Lecithin berechnet. Somit mussten die Zahlen für diesen Körper zu hoch ausfallen. Als Cerebrin wurde die Gewichts Differenz in Rechnung gebracht, welche das Gewicht des heissen alkoholischen Auszugs minus der aus seinem Phosphorgehalt berechneten Lecithinmenge ergab. Immerhin bewiesen die Petrowsky'schen Bestimmungen, dass das Cerebrin in überwiegendem Maasse der weissen Substanz zukam. Auf den Versuch Baumstark's, das Gehirn quantitativ zu erforschen, braucht hier nicht nochmals eingegangen zu werden, da derselbe Eingangs bereits Erwähnung fand.

Es sei hier noch angeführt, dass es neben unserem Verfahren zur Bestimmung des Protagon's möglich ist, festzustellen, wieviel vom Phosphor der P-haltigen Fette des Nervenmarks auf Protagon und wieviel auf andere Körper entfällt. Aus dem folgenden Versuch dürfte sich dies ergeben.

Es wurden zwei Portionen weisser Substanz vom Ochsenrückenmark abgewogen. In der einen Portion wurde nach unserem Verfahren der Protagonengehalt, in der andern der ganze P-Gehalt des heissen alkoholischen Extractes bestimmt, während ausserdem noch eine Trockenbestimmung ausgeführt wurde. Die erste Bestimmung ergab 25,02% Protagon (auf trockenes Gewebe bezogen), die zweite ergab 0,0277 gr. Phosphor in 1,7416 gr. trockener weisser Substanz. Nun würden diese 1,7416 gr. Substanz 0,4353 gr. Protagon enthalten = 0,005 gr. Phosphor, d. i. etwa 18% des gesammten ge-

1) Petrowsky: «Zusammensetzung der grauen und weissen Substanz des Gehirns». Pflüger's Archiv, Bd. III, S. 367.

2) Josephine Chevalier: «Chemische Untersuchung der Nervensubstanz». Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, S. 97.

fundenen Phosphors. Es blieben somit 0,0227 gr. P, welcher nicht auf Protagon entfiel. Für diesen Antheil des P kämen Lecithine und Kephaline in Betracht.

Da mir während meiner Untersuchungen auch zwei menschliche Gehirne aus frühen Entwicklungsstadien zur Verfügung standen, so machte ich den Versuch, ob nicht die ersten Anfänge der Markscheidenbildung, welche in diesem Organ noch vor der Geburt auftreten, sich mit Hülfe unserer Methode nachweisen liessen, so wie es von Witkowski¹⁾ für das Neurokeratin geschehen ist. Das eine der beiden Gehirne stammte von einer Frucht von 32 cm. Länge und wog 78,5 gr.²⁾ Nach Spaltung des alkoholischen Extractes desselben liess sich eine geringe Reduction nachweisen, aus der sich allerdings das Protagon nicht mit Genauigkeit berechnen liess. Es erklärt sich dies aus dem noch sehr geringen Gehalt an markhaltigen Fasern in dieser frühen Zeit. In dem zweiten Gehirn jedoch, welches von einer ausgetragenen und während der Geburt abgestorbenen Frucht war, und welches 362 gr. wog,³⁾ liess sich die Menge des Protagon's bereits auf 0,2944 gr. berechnen.

Ein weiter fortgeschrittenes Stadium bot das Gehirn eines 4 Monate alten Kindes.⁴⁾ Die linke Hemisphäre desselben wurde für sich allein verarbeitet und ergab 1,1375 gr. Protagon. Unter Voraussetzung einer übereinstimmenden Markentwicklung in beiden Hemisphären würde das ganze Grosshirn 2,2750 gr. Protagon enthalten haben. Zwischen-, Mittel-, Hinter- und Nachhirn wurden zusammen bestimmt und gaben 0,5626 gr. Protagon. Im ganzen Gehirn waren somit 2,8376 gr. Protagon enthalten.

Bezüglich der beiden ersten dieser drei Bestimmungen besteht wohl kein Widerspruch mit der Angabe Raske's,⁵⁾

1) Witkowski, Archiv f. Psychiatrie, Bd. XIV, Heft I (1882).

2) Vgl. hierzu Flechsig, Die Leitungsbahnen im Gehirn und Rückenmark des Menschen. Leipzig 1876, S. 21 u. 158.

3) Vgl. Flechsig, a. a. O. S. 30 u. 125 u. Abbild. Tafel III.

4) Vgl. Flechsig, a. a. O. Abbild. Tafel VI.

5) Raske, Zur chemischen Kenntniss des Embryos. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, S. 341.

welcher aus dem Gehirn eines Rindsembryos von 50 cm. Länge kein Cerebrin erhalten konnte. Es ist wenigstens möglich, dass um diese Zeit der Entwicklung des Rindes markhaltige Bahnen im Gehirn noch nicht ausgebildet sind. Meines Wissens liegen hierüber keine näheren Untersuchungen vor. Ferner muss man berücksichtigen, dass, selbst wenn schon geringe Mengen Protogons resp. Cerebrins vorhanden waren, dieselben der Darstellung entgehen konnten.

Unsere drei Fälle beweisen jedenfalls, dass die eingeschlagene Methode geeignet ist, durch die Anzeige des Protogongehaltes eines in der Entwicklung begriffenen Gehirns einen Schluss auf das Stadium seiner Markreifung zu gestatten. Aus den gefundenen Protogonmengen aber eine ziffermässige Berechnung der weissen Substanz etwa unter Zugrundelegung des oben gefundenen Mittelwerthes von 20,72% vorzunehmen, dürfte wohl nicht angängig sein, da die Beziehungen des Protogons zu den übrigen Bestandtheilen des Nervenmarks in so frühen Entwicklungsstadien sich unserer Kenntniss entziehen und die Verhältnisse des ausgewachsenen Gehirns nicht ohne Weiteres auf das jugendliche übertragen werden können.

Das ausgebildete Gehirn dürfte eher ein geeignetes Object bieten, an dem man die gefundenen Mengen Protogon des ganzen Organs in Grammen weisser Substanz ausdrücken könnte. Hierzu würde ein Interesse vorliegen, wenn man die Mengenverhältnisse grauer und weisser Substanz im normalen oder nichtnormalen Gehirn im Ganzen oder an einzelnen Theilen desselben bestimmen wollte. Die bis jetzt darauf gerichteten Methoden haben noch nicht zu übereinstimmenden Resultaten geführt. Bourgoin's¹⁾ ältere Methode besteht darin, das Verhältniss von grauer zu weisser Substanz aus dem Wassergehalt der beiden Substanzen im Vergleich zum Wassergehalt des ganzen Gehirns festzustellen. Danilewsky²⁾ dagegen stellt die specifischen Gewichte der grauen, weissen Substanz und

1) Bourgoin, Recherches chimiques sur le cerveau. Paris 1866.

2) Danilewsky, Centralblatt f. d. med. Wissensch. 1880, Nr. 14.

des ganzen Gehirns fest und findet in ähnlicher Weise daraus die Mengen grauer und weisser Substanz.

Man könnte nun versuchen so vorzugehen, dass man bei einem genau halbirten Gehirn den Protagongehalt der einen ganzen Hälfte feststellte. In der andern Hälfte bestimmte man den Protagongehalt einer abgewogenen Menge seiner weissen Substanz in Procenten ihres feuchten Gewichts. Aus den so gewonnenen beiden Zahlen liesse sich berechnen, ein wie grosser Theil der ersten Hälfte aus weisser Substanz bestehen müsste, und wenn man dieses Gewicht von dem feuchten Gewicht der ganzen Hälfte abzieht, so ergibt die Gewichts-differenz die Menge der grauen Substanz derselben. Man würde auf diesem Wege nicht sowohl die makroskopisch als graue und weisse Substanz bezeichneten Materien bestimmen, sondern die Summe der nervenmarkhaltigen gegenüber den marklosen Bezirken.

Quantitative Bestimmung des Protagons am degenerirten Nerven.

Gleichzeitig mit den im Vorstehenden geschilderten Untersuchungen unternahm ich es, Protagonbestimmungen mit Hülfe der oben beschriebenen Methode an solchen Nerven vorzunehmen, welche nach Durchtrennung von ihrem Centrum der Degeneration anheimgefallen waren. Als Material wählte ich nervi ischiadici möglichst grosser Hunde und verfuhr so, dass ich an der einen Extremität den Nerv durchschnitt, um nach einer bestimmten Zeit diesen dann mit dem der andern Extremität bezüglich des Protagongehaltes zu vergleichen.

Den Thieren wurde in Aethernarkose der Nerv möglichst hoch oben am Oberschenkel mit der Scheere entweder durchschnitten oder ein Stück desselben excidirt. Nachdem die Wunde geheilt war, blieben die Thiere verschieden lange noch am Leben und wurden dann zwecks Entnahme der Nerven getödtet. Letztere wurden dann an beiden Extremitäten möglichst frei von Bindegewebe herauspräparirt und zwar von einer noch oberhalb der Durchschneidungsstelle gelegenen Grenze an nach abwärts sammt peroneus und tibialis entlang

deren Verlauf am Unterschenkel. Nach der Herausnahme wurden beide Nerven bezüglich ihrer Längen noch einmal genau verglichen und so zurecht geschnitten, dass ihre Stämme und gleichartigen Endäste sich völlig deckten. Auf diese Weise sollte eine möglichst genaue Uebereinstimmung in den zu vergleichenden Mengen der Nervensubstanz erreicht werden. Durch Abwägen wäre dies nicht gelungen, weil jedesmal der operirte Nerv, einerlei ob es der rechte oder linke war, ein erheblich höheres Gewicht besass als der andere. In der Hauptsache dürfte diese Gewichtsdivergenz auf einen höheren Wassergehalt des operirten Nerven zurückzuführen sein, denn derselbe bot stets ein ödematöses Aussehen dar. Des Weiteren wurden dann die Nerven, jeder für sich, der Extraction mit Alkohol und Benzol unterzogen, wie es oben geschildert ist, und auch die Reduction gegen Fehling'sche Lösung in gleicher Weise bestimmt. Die Protonmengen in den Nerven selbst der grossen Hunde waren so gering, dass in jedem einzelnen Falle nur eine Bestimmung ausgeführt werden konnte. Trotzdem sind die gefundenen Zahlen als zuverlässig genug zu betrachten, um die aus ihnen gezogenen Schlussfolgerungen zuzulassen. Um aber ausserdem noch an einem grösseren Thier als dem Hund den Versuch zu wiederholen, führte ich die Durchschneidung des nervus ischiadicus auch am Pferd aus und liess dasselbe noch 14 Tage nach der Operation am Leben. In Anbetracht der grösseren Länge des Nerven dieses Thieres war es möglich, die periphere Nervenstrecke für sich allein und ausserdem noch den central von der Durchschneidungsstelle gelegenen Nervenabschnitt zu untersuchen. Ein zweites Pferd, welches in derselben Weise operirt war, sollte länger als das erste am Leben erhalten werden. Dies gelang jedoch nicht, es verendete vielmehr 8 Tage nach der Operation. Da bei diesem Thiere eine Infection der Wunde stattgefunden hatte, konnten der nervus peroneus und tibialis erst von der Knie-region nach abwärts verwandt werden.

Die Resultate, welche ich bei diesen Thierversuchen erhielt, stelle ich in folgender Tabelle (siehe S. 393) zusammen, indem ich die näheren Bemerkungen über die erfolgte Ope-

rationsweise im einzelnen Falle beifüge. Die jeweiligen gefundenen Kupfermengen sind auf Protagon berechnet und als solche notirt.

Durch diese Versuche soll nicht ein erschöpfendes Bild gegeben werden von den Veränderungen, welche sich mit Hülfe der quantitativen Bestimmungen des Protagon am degenerirten Nerven vom Beginn der Degeneration bis zu dem Zeitpunkt, wo kein Protagon mehr vorhanden ist, feststellen lassen. Dazu mangelte es an dem geeigneten Untersuchungsmaterial, das für die frühen Stadien der Degeneration um so reichlicher hätte vorhanden sein müssen, als hier geringe Differenzen in den gefundenen Protagonmengen aus dem oben bereits angeführten Grunde nicht ohne weitere Kontrolle beweisend sein konnten. Die vorliegenden Untersuchungen erstrecken sich also, abgesehen vom Versuch Nr. 1, nur auf den Zeitraum von der 2. bis 4. Woche nach Durchschneidung des Nerven.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, dass vom 14. Tage nach Durchtrennung des Nerven ab bei sämtlichen Thieren eine erhebliche Verminderung des Protagongehalts im degenerirten Nerven gegenüber dem normalen der andern Extremität sich gefunden hat. Nach 14 Tagen war beim Pferd auf der operirten Seite nur etwas mehr als halb soviel Protagon nachzuweisen als auf der gesunden, während beim Hund 16 Tage nach der Operation die Differenz eine noch grössere ist. Hierbei muss allerdings, wie für die anderen Versuche auch, berücksichtigt werden, dass bei verschiedenen langen Nerven verschiedener Thiere während des gleichen Zeitraumes die Degeneration verschieden weit fortgeschritten sein kann. Noch erheblicher wird die Abnahme des Protagon in den degenerirten Nerven des Hundes, welcher 23 Tage nach der Operation noch am Leben blieb, und im Falle Nr. 5 liess sich mit unserer Methode nach 4 Wochen Protagon überhaupt nicht mehr auf der kranken Seite nachweisen. Nun müssen ja bei diesem letzten Falle in dem kleinen centralen Ende des Nerven, welches zur Untersuchung mitverwandt war, grösstentheils wenigstens intacte Nervenfasern vorhanden gewesen sein, der Protagongehalt desselben war aber offenbar zu gering, um eine Reduction Fehling'scher Lösung unter den hier eingehaltenen Bedingungen

Nr.	Thierart.	Protagongehalt				Operationsweise.	Zur Untersuchung verwandt.
		Lebensdauer nach der Operation.	des gesunden Nerven in mg.	des operirten Nerven in mg.	des operirten Nerven in % des gesunden.		
1	Pferd	8 Tage	53,1	51,3	96,61 %	Resection eines 1 cm. langen Stücks des rechten nerv. ischiadicus in der Mitte des Oberschenkels.	Nerv. peroneus und tibialis von der Kniegegend abwärts.
2	Pferd	14 Tage	91,8	55,9	60,89 %	Durchschneidung des linken nerv. ischiadicus in der Mitte des Oberschenkels.	a) Von der Durchschneidungsstelle nach abwärts. b) Von der Durchschneidungsstelle aufwärts bis zur Glutacalregion.
3	Hund	16 Tage	61,4	33,0	53,75 %	Resection eines 1 cm. langen Stücks des rechten n. ischiadicus in der Höhe des tub. oss. ischii.	Nerv von einer 3 cm. oberhalb der Durchschneidungsstelle gelegenen Stelle nach abwärts.
4	Hund	23 Tage	60,0	28,6	47,66 %	Resection eines 1 cm. langen Stücks des linken n. ischiadicus in der Höhe des tub. oss. ischii.	Nerv von einer 6 cm. oberhalb der Durchschneidungsstelle gelegenen Stelle nach abwärts.
5	Hund	28 Tage	68,4	Keine Reduktion nachweisbar	—	Durchschneidung des linken nerv. ischiadicus in der Höhe des tuber ossis ischii.	

zu Stande kommen zu lassen. Umsomehr kann man für die periphere Strecke schliessen, dass in ihr das Protagon ganz oder fast ganz geschwunden war.

Bei dem Pferd, welches 8 Tage nach der Operation noch gelebt hatte, liessen sich in den verglichenen Nervenabschnitten der rechten und linken Extremität nur sehr geringe Unterschiede im Protagongehalt erkennen. Es sind also zu dieser Zeit in den Theilen des degenerirten Nerven, welche in weiterer Entfernung von der Durchschneidungsstelle liegen, mit unserer Methode diejenigen Veränderungen noch nicht deutlich nachweisbar, welche in den anderen Fällen bei Untersuchung der gesammten peripheren Strecke des Nerven nach längerer Zeit sich erkennen liessen.

Schliesslich sei noch auf das Ergebniss der Untersuchung des centralen Endes vom degenerirten Nerven hingewiesen, welches aus Nr. 2 der Zusammenstellung ersichtlich ist. Demnach hat auch dieser Abschnitt des operirten Nerven im Vergleich zur selben Stelle des gesunden Nerven eine Verminderung seines Protagongehaltes in geringem Maasse erfahren.

Bei dieser Erörterung der Versuchsergebnisse haben wir die in den Kupfermengen gefundenen Differenzen fortlaufend auf das Protagon übertragen. Es könnte dies jedoch zu einer falschen Auffassung führen. Aus der Verminderung des Reductionsvermögens, welches den operirten Nerven durchweg zukam, ist zunächst nur zu schliessen, dass derjenige Theil des Protagonmoleküls eine Abnahme erfahren hat, welcher den reducirenden Atomcomplexen entspricht. Man kann hieraus auch auf eine tiefergehende Veränderung des ganzen Protagonmoleküls schliessen und sagen, dass eben in dem Maasse von einem unveränderten Protagon nicht mehr die Rede sein kann, als ein Schwund dieses Theils desselben stattfindet. Aber es ist damit nicht bewiesen, dass auch die anderen Componenten des Protagons eine gleiche Abnahme erfahren.

Ebensowenig kann man die hier für das Protagon gefundenen Veränderungen auf das ganze Nervenmark übertragen. Dem widersprechen vor Allem die anatomischen Thatsachen. Es sei nur kurz darauf hingewiesen. Durch die mikroskopische

Untersuchung lassen sich degenerative Veränderungen in der Markscheide nachweisen, welche als eine Zerklüftung derselben beschrieben werden. Das Nervenmark zerfällt dabei in grössere und kleinere Schollen, welche schliesslich auch aus der Nervenfasern fortgeschafft werden. Dieser Vorgang spielt sich mit einer von der Läsionsstelle nach der Peripherie fortschreitenden Intensität ab und ergreift hauptsächlich den peripheren Nervenabschnitt. Aber, was auch für die Beurtheilung der vorliegenden Versuche von Belang ist, es lassen sich diese degenerativen Vorgänge im Nervenmark auch an einem beschränkten Theil der Fasern in dem centralen Nervenabschnitt verfolgen.

Der Zerfall des Nervenmarks geht indessen wohl nicht so schnell vor sich, dass 14 Tage nach der Durchschneidung des nerv. ischiadicus beim Hund oder Pferd in dessen ganzem peripheren Theil bis zum Fuss hinab nur noch etwa die Hälfte des Nervenmarks vorhanden oder nach 4 Wochen ein Schwund desselben bis auf Spuren eingetreten wäre. Dass dem nicht so sein kann, geht auch noch aus dem weiter unten mitgetheilten Befund hervor, bei welchem 15 Tage nach erfolgter Durchschneidung des nerv. ischiadicus eines Hundes der operirte Nerv noch etwa 77% seiner alkohollöslichen Bestandtheile besass.

Nach alledem muss das, was die vorliegenden Versuche ergeben, dahin zusammengefasst werden, dass bei der experimentell erzeugten Degeneration am peripheren Nerven (bei Hund und Pferd) in der Markscheide desselben chemische Veränderungen vor sich gehen, welche in einer Zersetzung des Protagons bestehen, dessen reducirende Antheile zum Schwinden kommen. Dieser Schwund ist insofern ein schneller, als 4 Wochen nach der Durchtrennung des Nerven dieser Theil des Protagonomoleküls in nur noch ganz geringer Menge oder gar nicht mehr in dem peripher von der Durchschneidungsstelle des Nerven gelegenen Abschnitt desselben vorhanden ist. In Uebereinstimmung mit der anatomischen Beschreibung der Degenerationserscheinungen am Nervenmark hat sich diese Veränderung, welche das Protagon erleidet, hauptsächlich für den peripheren Abschnitt des durchschnittenen Nerven ergeben, aber in dem einen darauf untersuchten Falle ist auch eine gleiche Ver-

änderung in dem centralen Abschnitt des Nerven nachzuweisen gewesen.

Die genaueren Beziehungen zu erkennen, welche zwischen den mikroskopisch sichtbaren Veränderungen des Nervenmarks und den hier gewonnenen chemischen Erscheinungen bestehen, ist an der Hand des vorliegenden Untersuchungsmaterials nicht möglich.

In einer anderen Weise, als es in den geschilderten Versuchen geschah, haben in letzter Zeit englische Forscher über Degenerationen im Bereich des Nervensystems Untersuchungen angestellt. Mott¹⁾ und Mott und Barratt²⁾ bestimmten nach Hemiplegien am Menschen den gesamten Phosphorgehalt beider Rückenmarkshälften und fanden stets auf der Seite, welche mikroskopisch die ausgedehntere Degeneration aufwies, den geringeren Phosphorgehalt. Die Verschiebungen im P-Gehalt werden von den Autoren auf eine Zersetzung des Lecithins zurückgeführt. Diese Auffassung findet nach ihnen eine Stütze darin, dass nach Untersuchungen von Mott und Halliburton³⁾ bei Gehirnerkrankungen, welche mit einem schnellen Schwund der Gehirnsubstanz und einer Vermehrung der Cerebrospinalflüssigkeit einhergingen, in letzterer Cholin, ein Zersetzungsprodukt des Lecithins, nachgewiesen werden konnte. Auch unter anderen pathologischen Verhältnissen ist eine Abnahme des Phosphors im Nervengewebe von ihnen gefunden worden; doch sind mir die genaueren Mittheilungen über diese Fälle nicht zugänglich gewesen.

Da es zu erwarten war, dass am peripheren Nerven die Differenzen im P-Gehalt sich noch stärker äussern würden, weil die Degeneration am Nerven eine verbreitetere sein würde, als am Rückenmark, und die P-haltigen Fette des Nerven fast

1) Mott: The General Pathologie of nutrition. «Allbutt's System of Medicine», vol. 1, p. 189.

2) Mott and Barratt: «Observations on the chemistry of nerve-degeneration». (Abstract). Proceedings of the Physiological Society, February 18, 1899.

3) Mott and Halliburton: Proceedings of the Physiological Society. February 13, 1897 und February 12, 1898, sowie February 18, 1899.

ausschliesslich der Markscheide zukommen, während beim Rückenmark ein Theil derselben noch auf die zelligen Bestandtheile der grauen Substanz entfallen, so führte ich auch eine P-Bestimmung an den nervi ischiadici eines Hundes aus, bei welchem, wie in den oben beschriebenen Fällen, der eine derselben und zwar der rechte durchschnitten worden war. Das Thier wurde 15 Tage nach der Operation getödtet. Der Phosphor wurde in den Rückständen der alkoholischen Extracte der Nerven bestimmt durch Schmelzen derselben mit Soda und Salpeter, und Wägen als $Mg_2P_2O_7$. Es fanden sich

im degenerirten (rechten) Nerven 0,0154 gr. $Mg_2P_2O_7$ = 0,0043 gr. P.
 „ gesunden (linken) „ 0,0228 „ $Mg_2P_2O_7$ = 0,00638 „ P.

Der P-Gehalt des operirten Nerven, in Procenten des gesunden ausgedrückt, ergäbe somit 67,4 %.

Die Wägung der getrockneten alkoholischen Extracte beider Nerven ergab

0,5912 gr. für den gesunden Nerven,
 0,4552 gr. „ „ operirten „

Das Alkohol-Extract des degenerirten Nerven betrug also noch 77 % von dem des gesunden Nerven.

Aus einem Vergleich dieser letzten Zahlen mit dem Ergebniss der Phosphorbestimmungen und demjenigen der Protagonbestimmungen des Hundes Nr. 3 obiger Zusammenstellung, welcher etwa das gleiche Stadium der Degeneration aufweist wie der vorliegende Versuch, folgt die Thatsache, dass die Abnahme der alkohollöslichen Bestandtheile des Nervenmarkes im Ganzen nicht so schnell vor sich geht, wie der Schwund des Phosphors der P-haltigen Fette und der reducirenden Substanzen des Protagns. Es kann hierin ein Hinweis darauf erblickt werden, dass die Fettsäurebestandtheile der Markscheide dem Nerven bei der Degeneration länger noch erhalten bleiben. Dies würde in Uebereinstimmung sein mit der Annahme, welche die englischen Autoren bezüglich der chemischen Vorgänge im Molekül des Lecithins geäussert haben.

Ein Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste.

Von

Dr. Eugen Petry (Graz).

(Aus dem chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt Rudolf-Stiftung zu Wien.
Vorstand: Dr. E. Freund.)

(Der Redaction zugegangen am 22. Mai 1899.)

Die nachstehenden Untersuchungen habe ich, auf Anregung des Herrn Doctor Freund, in der Absicht begonnen, dadurch Aufschlüsse über die Zusammensetzung des Carcinoms in chemischer Hinsicht zu gewinnen. Meine wesentliche Aufgabe war, das quantitative Verhältniss der darin enthaltenen löslichen Eiweisskörper festzustellen.

Im Verlaufe der Untersuchung ergaben sich Thatsachen, welche von dieser Frage abgeführt haben, jedoch als Beitrag zur Chemie maligner Geschwülste hier veröffentlicht werden mögen.

I. Methodik.

Die untersuchten Gewebe wurden möglichst bald nach der operativen Exstirpation (ca. 1 Stunde danach) resp. nach der Entnahme aus der Leiche vom umgebenden Gewebe gereinigt, zerkleinert und mit Hülfe eines Fleischschabinstrumentes in einen Brei verwandelt, welcher hierauf zuerst mit 0,6%iger Kochsalzlösung extrahirt wurde.

Der Kaltwasserextract wurde durch zweimaliges andauerndes Auslaugen der Masse und durch Vereinigung beider Auszüge gewonnen; der erste derselben wurde, um vollständige Extraction zu erzielen, durch einwöchentliche Digestion her-

gestellt.¹⁾ Der Rückstand vom Kaltwasserextract wurde zweimal mit 0,01 % iger Kalilauge extrahirt, beide Laugenextracte vereint untersucht.

Bei den späteren Untersuchungen wurde der Rückstand des Laugenauszugs noch zum Schlusse mit 1 % iger Kalilauge extrahirt.

Bei allen Extracten wurde stets darauf geachtet, dass durch genügenden Chloroform- resp. Toluolzusatz eine Entwicklung von Bacterien vermieden wurde.

Die Untersuchung erstreckte sich, wie Eingangs erwähnt, nur auf die in die Extracte übergegangenen Eiweisskörper.

Zunächst wurde die Gesamtmenge der coagulablen Eiweisskörper in den Extracten ermittelt und ihr Verhältniss zum Gesamtstickstoff der Extracte bestimmt.

Die Bestimmung des Eiweissgehalts geschah durch Aufkochen einer schwach angesäuerten Probe des Extracts und nachherige Wägung des auf gewogenem Filter gesammelten, mit heissem Wasser, Alkohol und Aether gewaschenen und bis zur Gewichtsconstanz getrockneten Niederschlags. In den meisten Fällen wurde einfach der Stickstoffgehalt der quantitativ abgetrennten Eiweissportionen ermittelt.

Ein Theil der im Kaltwasserextract enthaltenen Eiweisskörper konnte durch Halbsättigung des Extracts mit Ammonsulfat zum Ausfallen gebracht werden; es waren also globulinartige Substanzen in den Extract übergegangen.

Es liess sich ferner nachweisen, dass bei der Pepsinverdauung der im Extract enthaltenen Eiweisskörper ein phosphorhaltiger Niederschlag zurückblieb. Durch Ansäuern mit verdünnter Essigsäure konnte stets ein Eiweisskörper gefällt werden, welcher sich nicht im Ueberschuss der Säure, aber leicht in Natriumcarbonat löste und nach Entfernung alles anorganischen, sowie des an Lecithine gebundenen Phosphors (s. unten) sich als phosphorhaltig erwies.

¹⁾ Eine Ausnahme hiervon macht das Lebersarcom, dessen Extractionszeit ungefähr einen Monat betrug.

Der durch Essigsäure fällbare Eiweisskörper war somit als ein Nucleoproteid anzusehen.¹⁾

Es wurde mehrmals versucht, aus demselben durch Kochen mit Salzsäure und nachherige Behandlung mit Phenylhydrazin resp. Prüfung auf Reduction einen kohlehydratartigen Körper abzuspalten, was jedoch stets zu negativem Resultate führte.

Es war nun beabsichtigt, zu untersuchen, ob das quantitative Verhältniss der globulinartigen Substanz und des Nucleoproteids zum Gesamteiweiss Verschiedenheiten gegenüber dem Verhalten beim Kontrollgewebe aufweist.

Die globulinähnliche Substanz wurde nach Pohl²⁾ gefällt, durch destillirtes Wasser in Lösung gebracht, durch Aufkochen coagulirt und nun entweder das Gewicht oder der Stickstoffgehalt des sorgfältig gereinigten Niederschlags bestimmt.

Die Menge der Nucleoproteide wurde Anfangs durch die Bestimmung des Phosphorgehalts des Gesamteiweisses ermittelt, indem dem Hitzecoagulat durch Behandeln mit verdünnter Salzsäure und später mit Aether zunächst aller in Form von Phosphaten und Lecithinen beigemengter Phosphor entzogen, hierauf dasselbe mit Ammonnitrat und Natriumcarbonat verascht und der Phosphorgehalt der Asche als Tripelphosphat bestimmt wurde (nach vorheriger Reinigung durch Füllen mit Ammoniummolybdat und Lösung des Niederschlags in Ammoniak).

Bei den späteren Untersuchungen wurde das Nucleoproteid aus dem Kaltwasserextract durch schwaches Ansäuern mit Essigsäure und Ermittlung des Stickstoffgehalts des Niederschlags bestimmt.

Das Filtrat davon konnte nach Neutralisation zur Bestimmung des Globulins (Pohl) benützt werden. Die Menge der dabei in Lösung bleibenden Eiweisskörper wurde ebenfalls ermittelt und auf Albumin bezogen.

1) Die bei sämtlichen Carcinomen beobachtete Eigenschaft der Extracte, ungewöhnlich langsam zu filtriren, scheint an die Anwesenheit dieses Nucleoproteids gebunden zu sein, da sie nach der Ausfällung desselben mit Essigsäure den Extracten nicht mehr zukommt.

2) Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 20, S. 426.

Bei den Laugenextracten wurde nur die Menge des Gesamtstickstoffs und des an Eiweiss gebundenen Stickstoffs ermittelt.

II. Resultate.

Ich lasse nun die gewonnenen Zahlen folgen:

Carcinom I (Operation)

ein medulläres, sehr stark nekrotisches, erweichtes Mammacarcinom. 210 gr.

Der Kaltwasserextract

enthält 1,347 gr. Gesamt-N (Kjeldahl).

Die durch Wägung ermittelte Menge des

Gesamteiweisses beträgt 2,993 gr.

die der Globuline 0,238 gr.

der Albumine 2,755 gr.

0,45 gr. des Hitzecoagulats enthalten 0,0068 gr. an Eiweiss gebundenen Phosphor.

Der Laugenextract

enthält 0,644 gr. Gesamt-N,

davon entfällt auf fällbares Eiweiss . . . 0,196 gr. N.

Die Summe der in beiden Extracten enthaltenen Eiweissmengen repräsentirt auffallender Weise nur 33% vom Gesamtstickstoff (0,657 gr. gegenüber 1,99 gr. N).

Bei den nun folgenden Analysen wurden die Eiweisswerthe stets in gleicher Weise aus den Stickstoffwerthen des Eiweisses ermittelt und das Nucleoproteid durch Ansäuerung isolirt und zur Stickstoffbestimmung verwendet; daher lassen sich die gefundenen Zahlen in nachstehender Tabelle (siehe Seite 402) vereinigen.¹⁾

Schliesslich sollen noch die Resultate zweier Bestimmungen von Trockensubstanz und Asche angeführt werden.

Vom Carcinom I wurden 13,95 gr. des Breis bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und nachträglich verascht.

Das Trockengewicht betrug 3,06 gr. (21,42% der feuchten Substanz), das Gewicht der Asche 0,147 gr. (1,05%).

¹⁾ Als Kontrollgewebe wurde bei den Mammacarcinomen der die Knoten umgebende, makroskopisch unveränderte und deutliche Läppchen aufweisende Theil der in toto exstirpirten Drüse («Mamma»), beim Lebersarcom das erhaltene Lebergewebe verwendet.

		Carc. II (Oper.) exul- cerit, mäs- sig nekrot. Mamma- carcinom	Carc. III, mehrere harte Knoten in einer sonst unveränderten Mamma Operation		Carcinom IV stark nekrotischer Tumor (Operation)	Carc. V glatte scirröse Mamma Leiche	Sarcom Metastat. Lebersar- com einer Leiche		
			Carc. Gew. 38 gr.	Mamma Gew. 18 gr.	Carc. Gew. 23 gr.	Mamma Gew. 23 gr.		Sarcom Leber	
Kalt- wasser- extract (0,6% Na Cl)	Gesamtstickstoff	0,552 gr.	0,210 gr.	0,091 gr.	0,104 gr.	0,055 gr.	0,192 gr.	1,556 gr.	2,286 gr.
	Eiweissstickstoff (Procente v. Gesamt- stickstoff)	0,307 gr. (55,6 %)	0,107 gr. (50,9 %)	0,050 gr. (54,9 %)	0,070 gr. (68,9 %)	0,049 gr. (89 %)	0,080 gr. (41,2 %)	0,203 gr. (13 %)	0,344 gr. (15 %)
	Nucleoalbumin (Stickstoff) (Procente vom Eiweiss-N)	0,172 gr. (55,9 %)	0,068 gr. (63,4 %)	0,009 gr. (17,1 %)	0,035 gr. (49,02 %)	0,012 gr. (25 %)	0,039 gr. (48,8 %)	— (0 %)	0,134 gr. (38,8 %)
	Globulin (Stickstoff) (Procente vom Eiweiss-N)	0,073 gr. (23,7 %)	0,0068 gr. (6,3 %)	0,021 gr. (42,8 %)	0,0168 gr. (23,5 %)	0,013 gr. (26,8 %)	0,021 gr. (26,6 %)	0,038 gr. (19 %)	0,013 gr. (3,7 %)
	Albumin (Stickstoff) (Procente vom Eiweiss-N)	0,068 gr. (20,5 %)	0,032 gr. (30,3 %)	0,019 gr. (40,1 %)	0,018 gr. (27,4 %)	0,024 gr. (48,2 %)	0,0208 gr. (26 %)	— (81 %)	— (57,4 %)
0,01 % Kalliaugen- extract	Gesamtstickstoff	0,253 gr.	0,092 gr.	0,037 gr.	0,039 gr.	0,015 gr.	—	—	—
	Eiweissstickstoff (Procente v. Gesamt- stickstoff)	0,141 gr. (55,79 %)	0,044 gr. (47 %)	0,023 gr. (62,2 %)	0,025 gr. (65 %)	0,015 gr. (99 %)	—	—	—
	Gesamtstickstoff	—	0,149 gr.	0,032 gr.	0,041 gr.	0,073 gr.	0,04 gr.	gr.	—
1 % Kalliaugen- extract	Eiweissstickstoff (Procente v. Gesamt- stickstoff)	—	0,066 gr. (44 %)	—	0,020 gr. (48,7 %)	—	0,018 gr.	—	—

Bei einem weiter nicht verwendeten Lebercarcinome ergab sich das Gewicht der Trockensubstanz in zwei übereinstimmenden Bestimmungen zu 15,6% und das der Asche übereinstimmend zu 1,1%, während sich für das umgebende Lebergewebe ein Gehalt an Trockensubstanz von 23% und ein Aschengehalt von 1,1% des Gewichts der feuchten Masse ergab.

Betreffs der Frage nach dem quantitativen Verhältniss der einzelnen Eiweisskörper im Geschwulstgewebe im Vergleich zum normalen gaben die Untersuchungen wenig Aufschluss, da im Verhältniss von Globulinen zum Albumin schon beim Carcinom selbst durchaus keine Constanz herrscht.

Die quantitative Vermehrung des Nucleoproteids beim Carcinom (gegenüber dem Kontrollgewebe) muss hingegen als übereinstimmender Befund hervorgehoben werden, welcher auch durch Analysen von Carcinomen, die hier wegen der Unvollkommenheit der übrigen Resultate nicht aufgenommen wurden, bestätigt wird.

Der auf das Nucleoprotein entfallende Antheil beträgt beim Carcinom ca. 50% und mehr (vom Gesamteiweiss), während die Werthe bei der Mamma weit unter 30% liegen; es lässt sich dies mit dem Kernreichthum des üppig wuchernden Gewebes in Beziehung bringen.

Beim Sarcom konnte im Kochsalzauszug durch Essigsäurezusatz nur eine spurenweise Trübung erzeugt werden.

Die interessantesten Ergebnisse zeigten sich bezüglich der Relation zwischen dem Gesamtstickstoff und dem an coagulables Eiweiss gebundenen Stickstoff. Nur beim Kontrollgewebe (Mamma) des Carcinoms IV erscheint nahezu der ganze Stickstoff in Form von coagulablem Eiweiss; bei den übrigen Fällen beträgt das Eiweiss nur 68,9—41,5% vom Gesamtstickstoff, beim Lebersarcom nur 13%.

Der enteiuweiste Extract gab stets mit Jodquecksilberkalium und Salzsäure Trübung, mit Phosphorwolframsäure voluminösen Niederschlag.

Beim Lebersarcom konnte im Filtrat vom Hitzecoagulat durch Fällung mit Alkohol eine grosse Menge (entsprechend 1 gr. Eiweiss ca. 3 gr.) eines gelbbraunen Körpers gewonnen werden, der nach der Fällung mit Alkohol wieder in Wasser

und verdünnten Laugen zu einer schaumigen Lösung löslich war, Biuretreaction gab, nicht aber Xanthoproteinsäure-, Millon'sche und Molisch'sche Reaction. Er blieb in der Hitze unverändert, war durch Ferrocyankalium und Essigsäure nicht fällbar, Phosphorwolframsäure fällte den Körper, das Filtrat davon gab nicht mehr Biuretreaction; Jodquecksilberkalium und Salzsäure gab nur eine intensive Trübung.

III. Versuche über Autodigestion beim Carcinomgewebe.

An den mitgetheilten Analysen fällt besonders die grosse Menge von nicht eiweissartigem Stickstoff in den Extractflüssigkeiten auf.

Ueber die Natur der betreffenden, nicht coagulablen stickstoffhaltigen Stoffe war zunächst nur zu ermitteln, dass es sich, zum Theil wenigstens, um Stoffe vom Charakter der Albumosen handelte.

Es ergab sich nun die Frage, ob die Anwesenheit solcher stickstoffhaltigen Verbindungen einem intravitalen Zustand entspreche, oder erst nachträglich während der Extraction durch einen postmortalen Vorgang entstehe. Um dies zu entscheiden, wurde ein Carcinomknoten noch lebenswarm in zwei Hälften getheilt, dann eine sofort zerkleinert und auf 5 Minuten in siedendes Wasser gebracht, während die andere in der gewöhnlichen Weise behandelt wurde. Die Beweiskraft dieses Versuches wurde dadurch wesentlich geschmälert, dass möglicher Weise Leim in Lösung gegangen war, und der Versuch, den Leim durch Trichloressigsäure zu entfernen, daran scheiterte, dass auch andere stickstoffhaltige Substanzen dabei entfernt wurden.

Eine Entscheidung der Frage wurde erzielt, als bei einem weiteren Falle ein exstirpirtes Mammacarcinom unmittelbar nach der Operation in zwei Hälften getheilt wurde und die eine Hälfte in der gewöhnlichen Weise, die andere Hälfte aber derart untersucht wurde, dass die rasch zerkleinerte Geschwulst in absoluten Alkohol vertheilt und 48 Stunden in demselben belassen wurde, und nun erst ein wässriger, schwach alkalischer und stark alkalischer Auszug gemacht wurden.

Während sich bei der einen Hälfte Zahlen ergaben, die ähnlich den vorerwähnten sind, fand sich bei der mit Alkohol behandelten Portion im ersten wässerigen Auszug ein Eiweissgehalt von 86%, im schwach alkalischen Auszug ein Eiweissgehalt von 80% und im stark alkalischen Extract von 84% des überhaupt in Lösung befindlichen Stickstoffs.

Ich glaube daher das Vorkommen der nicht coagulirbaren stickstoffhaltigen Substanzen in der nicht mit Alkohol abgetödteten Portion auf eine nachträgliche Bildung aus Eiweissstoffen beziehen zu dürfen.

Dass derartige Umwandlungen im Verlaufe einer länger dauernden Digestion bei Zimmertemperatur thatsächlich vor sich gehen, liess sich in zwei weiteren Fällen durch die qualitative Untersuchung nachweisen.

Der erste betraf ein Mammacarcinom, der zweite carcinomatöse Lymphdrüsen (Metastasen eines Mammacarcinoms). Beide Organe wurden rasch nach der Operation zerkleinert und mit 0,6%iger Kochsalzlösung digerirt. Zur Verhinderung einer bakteriellen Zersetzung war dem Lymphdrüsencarcinom Toluol zugesetzt worden, während der Mammatumor in zwei Portionen getrennt wurde, deren eine durch Chloroformzusatz vor Fäulniss geschützt wurde, während bei der anderen ebenfalls Toluol verwendet wurde.

Es sei gleich erwähnt, dass sich beide Mammaextracte bezüglich der nun folgenden Reactionen zu jeder Zeit gleich verhielten.

Bereits in den ersten Tagen der Digestion wurden den Extracten Proben entnommen und untersucht. Es liess sich nach Entfernung des Eiweisses durch Aufkochen keine Biuretreaction erhalten, Jodquecksilberkalium und Salzsäure verursachten nur geringe Trübung, Phosphorwolframsäure einen Niederschlag. Durch Sättigung des Filtrats mit Ammonsulfat konnte kein Niederschlag erzeugt werden.

Am Ende der dritten Woche liess sich eine intensivere Reaction mit Phosphorwolframsäure (im Vergleich zum anfänglichen Befund) constatiren, Biuretreaction liess sich jedoch keineswegs nachweisen, und Sättigung mit Ammonsulfat ver-

mochte selbst in saurer Lösung keinen Niederschlag zu erzeugen.

Die Extracte wurden hierauf bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen und die Auszüge vom Mammacarcinom erst nach einem Monate wieder untersucht. Bei der Enteiweissung fiel auf, dass das Hitzecoagulat bedeutend spärlicher geworden war. Das Filtrat davon zeigte nun schwache Biuretreaction: durch Sättigung mit Ammonsulfat liess sich eine deutliche Trübung erzeugen.

Jodquecksilberkalium erzeugte nunmehr einen flockigen, wenn auch spärlichen Niederschlag.

1 Monat später (also nach 3 monatlicher Digestion bei Zimmertemperatur) liess sich ein ganz ähnlicher Befund constatiren, es hatte aber die Menge der aussalzbaren Substanzen (im Filtrate vom Eiweiss) zugenommen. Der durch Sättigung mit Ammonsulfat entstandene spärliche, flockige Niederschlag löste sich beim Erwärmen und trat in der Kälte wieder auf; die übrigen Reactionen gaben das gleiche Resultat wie bei der letzten Untersuchung. Prüfung mit Millon'schem Reagens, sowie mit Essigsäure und Ferrocyankalium fiel negativ aus, Xanthoproteinreaction konnte nur andeutungsweise constatirt werden, Zusatz von Bromwasser verursachte keine Farbänderung, aber es entstand ein spärlicher weisser Niederschlag.

Die quantitative Untersuchung, welche nur an der mit Toluol versetzten Portion der Mamma ausgeführt wurde, ergab zu dieser Zeit auf 10 ccm Extract einen Gesamteiweissgehalt von 0,0098 gr., während das von Eiweiss befreite Filtrat von 10 ccm. Extract 0,0085 gr. (also 87% Extractiv-) N enthielt.

Beim Extract der Lymphdrüsengeschwülste konnten zur selben Zeit im enteieissten Auszug die gleichen Reactionen erhalten werden mit Ausnahme des Umstandes, dass die Millon'sche Reaction sich als schwach positiv erwies. Albumosen, welche zu Anfang ganz fehlten, konnten auch hier nunmehr in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, stösst die quantitative Bestimmung der Eiweisskörper der malignen Geschwülste bei

Anwendung indifferenten Extractionsmittel auf die unerwartete Schwierigkeit, dass ein merklicher Theil der Eiweisskörper bei Digestion in Zimmertemperatur bei Fernhalten der Fäulniss in nicht mehr coagulable Verbindungen übergeht, unter denen sich, allerdings stets nur in geringen Mengen und nicht immer, albumosenartige Stoffe nachweisen lassen.

Es handelt sich hier somit um einen Vorgang, der von E. Salkowski, Schwiening und Biondi beobachtet und als Autodigestion bezeichnet worden ist.¹⁾

Wie Biondi quantitativ feststellt, sind dabei das Hauptprodukt nicht Albumosen und Peptone, sondern weiter absteigende, keine Biuretreaction mehr gebende Substanzen.

Aus einem meiner Versuche (Carcinom IV) geht hervor, dass das normale Mammagewebe eine ähnliche Veränderung nicht, oder doch nicht entfernt im gleichen Umfange zeigt, wie das erkrankte Mammagewebe. Es scheint sich somit um eine den malignen Geschwülsten eigenthümliche Steigerung einer auch in den normalen Geweben vorhandenen Eigenschaft zu handeln; inwiefern dieselbe als pathognomonisch für maligne Geschwülste angesehen werden darf, und inwieweit der postmortale Vorgang zum Verständniss gewisser morphologischer Eigenthümlichkeiten der malignen Neoplasmen (rascher Zerfall, partielle Rückresorption, Arrosion des normalen Gewebes) beitragen kann, entzieht sich vorerst der Beurtheilung.

Zum Schlusse sei mir gestattet, Herrn Dr. Freund für die gütige Ueberlassung des Themas und die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung dieser Untersuchung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

¹⁾ Salkowski, Zeitschr. f. klin. Medicin, Bd. 17, Suppl. 77. Schwiening, Virchow's Archiv 1894, p. 444. Biondi, Virchow's Archiv 1896, Bd. 144.

Die Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch beim Hunde, beim Schwein, beim Schaf, bei der Ziege und beim Meerschweinchen.

Von

Emil Abderhalden, cand. med.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Prof. G. v. Bunge in Basel.)

(Der Redaction zugegangen am 24. Mai 1899.)

Im Anschluss an die von mir früher publicirte Arbeit,¹⁾ die Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch beim Kaninchen, bei der Katze und beim Hund betreffend, suchte ich diese Beziehungen auch beim Meerschweinchen, beim Schwein, beim Schaf und bei der Ziege festzustellen. In der erwähnten Arbeit verfügte ich nur beim Kaninchen über Milchanalysen, welche vom Tage der Geburt des Wurfes an bis zur erreichten Gewichtsverdopplung desselben ausgeführt worden waren. Nach derselben Methode führte ich nun beim Hunde, beim Meerschweinchen, beim Schwein, beim Schaf und bei der Ziege Milchanalysen aus. Zugleich wurde der Wurf des Thieres, von welchem die Milch täglich analysirt wurde, vom Tage der Geburt an bis über die Gewichtsverdopplung hinaus alle Tage gewogen. Nimmt man aus sämtlichen Milchanalysen vom Tage der Geburt an bis zur eingetretenen Gewichtsverdopplung das Mittel, so erhält man ganz genau die der Zeit, welche bis zum Eintritt der Verdopplung des Anfangsgewichtes vergeht, entsprechenden Werthe der die Milch zusammensetzenden Verbindungen. Neben dem Umstande,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, Heft 5, S. 487, 1899.

dass die so ausgeführten Bestimmungen allein zur genauen Feststellung der genannten Beziehungen brauchbar sind, haben die so gefundenen Werthe auch den Vortheil einer sehr guten Vergleichbarkeit derselben bei verschiedenen Thierspecies.

Die Methode der Analyse war dieselbe wie bei den früheren Analysen, nur wurde das Fett aus dem Caseinniederschlage nur 6—8 Stunden im Soxhlet'schen Apparat extrahirt. Wie ich mich durch zahlreiche Kontrollen überzeugete, genügte diese Zeit vollauf zur vollständigen Fettextraction der genannten Niederschläge. Vor der Ausfällung des Caseins mit Essigsäure wurde die Milch nicht nur mit dem 20fachen Volumen Wasser verdünnt, wie es Hoppe-Seyler¹⁾ vorschreibt, sondern mit dem 30—40fachen Volumen. Bei dieser Verdünnung schied sich in allen untersuchten Fällen das Casein in grossen Flocken ab und setzte sich rasch zu Boden. Die über dem Niederschlage befindliche Lösung zeigte nicht die geringste Opalescenz.

Im Folgenden gebe ich die bei den untersuchten Thierspecies gefundenen Resultate wieder.

I. Hund.

Beim Hund wurden noch zwei weitere Bestimmungen der Zeit, welche vergeht, bis das Anfangsgewicht des Wurfes sich verdoppelt, ausgeführt. Die in der oben genannten Arbeit ausgeführte Bestimmung hatte 8 Tage ergeben. Ausserdem wurden an Hund I vom Tage der Geburt an bis über die Gewichtsverdopplung des Wurfes hinaus täglich Milchanalysen ausgeführt. An Hund II wurde die Milch während der Verdoppelungszeit dreimal der Analyse unterworfen.

Hund I. Alter des Thieres zur Zeit der Geburt ca. 2 Jahre. Die Zahl der geworfenen und gewogenen Jungen betrug 4. Datum der Geburt: 7. I. 1899.

I. Gewichtsbestimmung.

Das Gewicht des ganzen Wurfes betrug:

am 7. I. 1899	650,0 gr.	am 9. I. 1899	700,0 gr.
„ 8. I. 1899	670,0 „	„ 10. I. 1899	775,0 „

¹⁾ Hoppe-Seyler, Handbuch der phys. u. path. chemischen Analyse, Aufl. 6, 1893, S. 462.

am 11. I. 1899	830,0 gr.	am 19. I. 1899	1480,0 gr.
» 12. I. 1899	910,0 »	» 20. I. 1899	1560,0 »
» 13. I. 1899	960,0 »	» 21. I. 1899	1620,0 »
» 14. I. 1899	980,0 »	» 22. I. 1899	1700,0 »
» 15. I. 1899	1180,0 »	» 23. I. 1899	1760,0 »
» 16. I. 1899	1300,0 »	» 24. I. 1899	1870,0 »
» 17. I. 1899	1350,0 »	» 25. I. 1899	1960,0 »
» 18. I. 1899	1400,0 »	» 26. I. 1899	2020,0 »

Die Verdopplung des Anfangsgewichtes erfolgte somit in 9 Tagen.

II. Milchanalysen.

Die Milch wurde durch Streichen der Zitzen erhalten. Der Hund stellte der Gewinnung derselben keinen Widerstand entgegen. Vom Tage der Geburt an (7. I. 1899) bis zum 18. I. 1899 wurden täglich in einem Theil der gewonnenen Milch Casein, Albumin, Fett und Zucker bestimmt. Der andere Theil der gewonnenen Milch wurde vom 7. I. bis 16. I. in einer gut verschlossenen Flasche aufbewahrt. Um den Eintritt des Sauerwerdens derselben zu verhindern, wurde ein Tropfen Carbolsäure zur Milch zugesetzt und dieselbe ausserdem auf Eis aufbewahrt. Dieser Theil der Milch wurde zur Aschenanalyse verwendet.

Im Folgenden gebe ich die erhaltenen Resultate:

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Hundemilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
7. I. 1899	6,17	3,03	9,20	12,32	3,10
8. I. 1899	4,57	2,65	7,22	10,56	3,15
9. I. 1899	4,51	2,68	7,19	10,73	3,20
10. I. 1899	4,74	2,60	7,34	11,89	3,22
11. I. 1899	4,70	2,61	7,31	11,81	3,25
12. I. 1899	4,60	2,82	7,42	11,85	3,27
13. I. 1899	4,87	2,43	7,30	12,21	3,30
14. I. 1899	4,62	2,65	7,27	11,52	3,33
15. I. 1899	4,74	2,51	7,25	11,87	3,32
16. I. 1899	4,52	2,38	6,90	11,44	3,25
17. I. 1899	4,42	2,25	6,67	11,49	3,40
18. I. 1899	4,42	2,44	6,86	11,14	3,45

Das Mittel aus den Milchanalysen vom 7.—16. Januar ergibt:

Casein	4,80%	} Summe 7,44%.
Albumin	2,64%	
Fett	11,62%	
Zucker	3,24%	

Das Mittel aus den vom 17.—18. Januar ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,42%	} Summe 6,76%.
Albumin	2,34%	
Fett	11,81%	
Zucker	3,42%	

Analytische Belege.

Vom 7. I. 1899:	4,4882 gr. Milch gaben	0,8312 gr. Casein und Fett
	hieraus	0,5532 » Fett = 12,32%
	und	0,2770 » Casein = 6,17%
	4,4882 gr. Milch gaben	0,1362 » Albumin = 3,03%
Vom 8. I. 1899:	6,7722 » » »	1,0322 » Casein und Fett
	hieraus	0,7152 » Fett = 10,56%
	und	0,3098 » Casein = 4,57%
	6,7722 gr. Milch gaben	0,1800 » Albumin = 2,65%
Vom 9. I. 1899:	6,0002 » » »	0,9154 » Casein und Fett
	hieraus	0,6442 » Fett = 10,73%
	und	0,2712 » Casein = 4,51%
	6,0002 gr. Milch gaben	0,1612 » Albumin = 2,68%
Vom 10. I. 1899:	4,2223 » » »	0,7026 » Casein und Fett
	hieraus	0,5023 » Fett = 11,89%
	und	0,2002 » Casein = 4,74%
	4,2223 gr. Milch gaben	0,1102 » Albumin = 2,60%
Vom 11. I. 1899:	4,2522 » » »	0,7029 » Casein und Fett
	hieraus	0,5025 » Fett = 11,81%
	und	0,2002 » Casein = 4,70%
	4,2522 gr. Milch gaben	0,1112 » Albumin = 2,61%
Vom 12. I. 1899:	4,3220 » » »	0,7120 » Casein und Fett
	hieraus	0,5122 » Fett = 11,85%
	und	0,1989 » Casein = 4,60%
	4,3220 gr. Milch gaben	0,1222 » Albumin = 2,82%
Vom 13. I. 1899:	4,1112 » » »	0,7027 » Casein und Fett
	hieraus	0,5022 » Fett = 12,21%
	und	0,2005 » Casein = 4,87%
	4,1112 gr. Milch gaben	0,1002 » Albumin = 2,43%

Vom 14. I. 1899:	4,5322 gr. Milch gaben	0,7324 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,5223	» Fett = 11,52%
	und	0,2098	» Casein = 4,62%
	4,5322 gr. Milch gaben	0,1202	» Albumin = 2,65%
Vom 15. I. 1899:	4,2212 » » »	0,7018	» Casein und Fett
	hierauf	0,5012	» Fett = 11,87%
	und	0,2001	» Casein = 4,74%
	4,2212 gr. Milch gaben	0,1061	» Albumin = 2,51%
Vom 16. I. 1899:	4,5522 » » »	0,7280	» Casein und Fett
	hierauf	0,5212	» Fett = 11,44%
	und	0,2062	» Casein = 4,52%
	4,5522 gr. Milch gaben	0,1086	» Albumin = 2,38%
Vom 17. I. 1899:	4,5223 » » »	0,7209	» Casein und Fett
	hierauf	0,5200	» Fett = 11,49%
	und	0,2003	» Casein = 4,42%
	4,5223 gr. Milch gaben	0,1022	» Albumin = 2,25%
Vom 18. I. 1899:	4,4881 » » »	0,6990	» Casein und Fett
	hierauf	0,5002	» Fett = 11,14%
	und	0,1986	» Casein = 4,42%
	4,4881 gr. Milch gaben	0,1098	» Albumin = 2,44%

Die Aschenanalyse der vom 7.—16. Januar gesammelten Milch ergab folgendes Resultat:

100 Theile Hundemilch enthalten:

0,1382 gr. K_2O
0,0779 » Na_2O
0,1656 » Cl
0,0020 » Fe_2O_3
0,4545 » CaO
0,0195 » MgO
0,5078 » P_2O_5
1,3655 gr. Summe der Aschenbestandtheile.
0,0373 » Sauerstoffäquivalent des Chlors.
1,3282 gr. Asche.

Zahlenbelege.

52,2211 gr. Milch gaben	0,1912 gr. $KCl + NaCl$	
hierauf	0,3746 » K_2PtCl_6	
daraus berechnet . .	0,1144 » $KCl = 0,0722$ gr. K_2O	= 0,1382%
und	0,0768 » $NaCl = 0,0407$ » Na_2O	= 0,0779%
50,3228 gr. Milch gaben	0,3502 » $AgCl = 0,0865$ » Chlor	= 0,1656%
110,0234 » » »	0,0042 » Fe_2O_3, P_2O_5	

hieraus berechnet . . 0,0023 gr. $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0020\%$
 und 0,0019 » P_2O_5 .
 110,0234 gr. Milch gaben 0,5001 » $\text{CaO} = 0,4545\%$
 110,0234 » » » 0,0598 » $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0215$ gr. $\text{MgO} = 0,0195\%$
 und 0,0382 » P_2O_5 .
 110,0234 gr. Milch gaben 0,8111 » $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,5187$ gr. P_2O_5 .
 Gesamt-Phosphorsäure = 0,5588 gr. = 0,5078%.

II. Hund.

Alter des Thieres zur Zeit der Geburt ca. 8 Jahre. Zahl der
 geworfenen Jungen: 4. Datum der Geburt: 13. December 1898.

Gewichte des ganzen Wurfs:

am 13. XII. 1898	600,0 gr.	am 23. XII. 1898	1300,0 gr.
» 14. XII. 1898	675,0 »	» 24. XII. 1898	1375,0 »
» 15. XII. 1898	739,0 »	» 25. XII. 1898	1450,0 »
» 16. XII. 1898	787,0 »	» 26. XII. 1898	1520,0 »
» 17. XII. 1898	835,0 »	» 27. XII. 1898	1597,0 »
» 18. XII. 1898	905,0 »	» 28. XII. 1898	1680,0 »
» 19. XII. 1898	970,0 »	» 29. XII. 1898	1756,0 »
» 20. XII. 1898	1057,0 »	» 30. XII. 1898	1800,0 »
» 21. XII. 1898	1130,0 »	» 31. XII. 1898	1880,0 »
» 22. XII. 1898	1249,0 »		

Die Verdoppelung des Anfangsgewichtes erfolgte somit in
 9 Tagen.

Milchanalysen.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Hundemilch enthalten:				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
13. XII. 1898	5,62	2,72	8,34	14,61	3,15
18. XII. 1898	4,69	2,37	7,06	11,51	3,25
22. XII. 1898	4,23	2,19	6,42	10,44	3,30
Im Mittel	4,84	2,43	7,27	12,19	3,23

28*

Zahlenbelege.

Vom 13. XII. 1898:	4,5012 gr. Milch gaben	0,8113 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,6578	» Fett = 14,61%
	und	0,2532	» Casein = 5,62%
	4,5012 gr. Milch gaben	0,1225	» Albumin = 2,72%
Vom 18. XII. 1898:	4,2222 » » »	0,6850	» Casein und Fett
	hierauf	0,4862	» Fett = 11,51%
	und	0,1984	» Casein = 4,69%
	4,2222 gr. Milch gaben	0,1002	» Albumin = 2,37%
Vom 22. XII. 1898:	5,0121 » » »	0,6357	» Fett und Casein
	hierauf	0,5233	» Fett = 10,44%
	und	0,2122	» Casein = 4,23%
	5,0121 gr. Milch gaben	0,1098	» Albumin = 2,19%

II. Schwein.

Beim Schwein wurden im Ganzen fünf Gewichtsbestimmungen ausgeführt, und zwar drei Wägungen des ganzen Wurfes und zwei Wägungen eines einzelnen Thieres. Von dreien dieser Thiere, deren Junge gewogen wurden, wurden täglich Milchanalysen ausgeführt. Die Wägungen der Jungen sowohl als die Melkung waren mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Die Schweine säugen ihre Jungen im Allgemeinen nur in ganz bestimmten Intervallen. Sobald sich die Drüsen mit Milch gefüllt haben, legt sich das Mutterschwein auf die Seite und lockt seine Jungen herbei. Dieser Moment musste immer zur Melkung abgepasst werden, denn nur dann, wenn die Jungen sogen, liess sich Milch gewinnen. Es empfiehlt sich sehr, gleich von Anfang an eine von den Jungen nicht belegte Zitze zur Ausmelkung zu bestimmen. Die jungen Schweinchen nehmen, so viel ich beobachten konnte, und wie mir die Schweinezüchter mittheilten, stets dieselben Zitzen in Anspruch; jedes junge Thier besitzt seine bestimmte Zitze. Macht man ihnen dieselbe streitig, so entsteht Unruhe, und die Melkung ist vereitelt. Es lässt sich die von den Jungen nicht benutzte Zitze nur durch möglichst wiederholtes, täglich vorgenommenes Melken in Function erhalten. Ein einmaliges längeres Aussetzen der Melkung kann die sofortige Versiegung der Milchsecretion zur Folge haben.

Auch hier wurden täglich Bestimmungen der Eiweisskörper, des Fettes und des Zuckers ausgeführt. Von jedem Tage wurde ein Theil der gesammelten Milch zur Aschenanalyse reservirt. Dieser Theil wurde, bis sich eine grössere Menge angesammelt hatte, auf Eis aufbewahrt.

Schwein I.

Das zu den folgenden Bestimmungen verwendete Schwein warf am 7. I. 1899 (Abends 4—9 Uhr) 7 Junge. Zur Zeit der Geburt war dasselbe ca. 1 1/2 Jahre alt. Es war dies das zweite Mal, dass das Schwein Junge warf. Die erste Geburt hatte im August 1898 stattgefunden. Die Zahl der Jungen betrug damals zwei.

Die Wägung des ganzen Wurfes war leider unmöglich. Es wurde deshalb ein beliebiges Thier des Wurfes markirt und täglich gewogen. Ich hatte mich bei der ersten Wägung überzeugt, dass zwei beliebig gewählte Junge beinahe dasselbe Gewicht hatten. Es darf wohl angenommen werden, dass die Zeit, welche das eine täglich gewogene Thier bis zur Gewichtsverdoppelung gebraucht hat, sich mit der vom ganzen Wurf bis zum Eintritt der letzteren gebrauchten deckt. Einen Beleg hierfür liefern die Wägungen beim Schwein II.

I. Gewichtsbestimmung.

Ein einzelnes Thier aus dem am 7. I. 1899 (Abends) geworfenen Wurf wog am 8. I. 1899 (Morgens) 1500,0 gr.

Dasselbe Thier wog:

am 11. I. 1899 1700,0 gr.	am 19. I. 1899 2700,0 gr.
» 12. I. 1899 1850,0 »	» 20. I. 1899 2800,0 »
» 13. I. 1899 2025,0 »	» 21. I. 1899 2900,0 »
» 14. I. 1899 2150,0 »	» 22. I. 1899 3000,0 »
» 15. I. 1899 2300,0 »	» 23. I. 1899 2950,0 »
» 16. I. 1899 2350,0 »	» 24. I. 1899 3000,0 »
» 17. I. 1899 2500,0 »	» 25. I. 1899 3100,0 »
» 18. I. 1899 2600,0 »	» 26. I. 1899 3200,0 »

Die Verdoppelung des Anfangsgewichtes erfolgte am 22. I. 1899, also in 14 Tagen. Die am 23. I. eingetretene Abnahme des Körpergewichtes erklärt sich durch die aus nicht

sicher feststellbarer Ursache (wahrscheinlich trug die plötzlich eingetretene Kälte Schuld daran) eingetretene heftige Diarrhoe.

Milchanalysen.

Die Gewinnung der Milch war hier eine äusserst mühsame. Die einzelnen Melkungen ergaben nur wenige Cubikcentimeter Milch. Die Milch wurde in kleine, weithalsige Fläschchen (Waggläschen) mit eingeschliffenen Stöpseln gemolken. Nach jeder Melkung wurde die Flasche rasch geschlossen.

Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht der durch die täglich ausgeführten Analysen erhaltenen Werthe, das Casein, Albumin, Fett und den Zucker betreffend.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe Casein und Albumin	Fett	Zucker
10. Jan. 1899	5,50	1,79	7,29	3,69	3,25
11. » 1899	3,94	1,58	5,52	9,22	2,95
12. » 1899	3,54	1,53	5,07	9,19	2,95
13. » 1899	3,28	1,04	4,32	7,21	3,12
14. » 1899	3,62	1,50	5,12	9,63	3,45
15. » 1899	4,32	1,74	6,06	9,09	3,25
16. » 1899	3,98	1,33	5,31	9,40	3,50
17. » 1899	3,78	1,19	4,97	8,59	3,55
18. » 1899	3,00	1,41	4,41	8,74	3,25
19. » 1899	3,67	1,45	5,12	12,91	3,66
20. » 1899	3,76	1,38	5,14	12,47	3,30
21. » 1899	3,65	1,38	5,03	13,40	3,60
22. » 1899	2,94	1,51	4,45	10,47	3,12
23. » 1899	3,71	1,15	4,86	11,25	3,61
24. » 1899	3,09	1,09	4,18	10,02	3,72
25. » 1899	3,00	1,41	4,41	12,92	3,75
26. » 1899	3,14	1,15	4,29	10,78	3,81
27. » 1899	3,00	1,40	4,40	12,56	3,92
28. » 1899	2,98	1,39	4,37	12,68	3,85
29. » 1899	2,96	1,35	4,31	12,49	3,92
30. » 1899	2,92	1,33	4,25	12,07	3,92
31. » 1899	2,89	1,34	4,23	12,84	4,10

Das Mittel aus den vom 10. I. — 22. I. ausgeführten Analysen ergibt:

Casein	3,76 ‰	} Summe 5,21 ‰
Albumin	1,45 ‰	
Fett	9,54 ‰	
Zucker	3,30 ‰	

Das Mittel aus den vom 23. I. — 31. I. ausgeführten Analysen ergab:

Casein	3,07 ‰	} Summe 4,36 ‰
Albumin	1,29 ‰	
Fett	11,95 ‰	
Zucker	3,84 ‰	

Zahlenbelege.

Vom 10. I. 1899:	5,1564 gr. Milch gaben	0,4753 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,1903	» Fett = 3,69 ‰
	und	0,2841	» Casein = 5,50 ‰
	5,1564 gr. Milch gaben	0,0923	» Albumin = 1,79 ‰
Vom 11. I. 1899:	5,0274 » » »	0,6632	» Casein und Fett
	hierauf	0,4639	» Fett = 9,22 ‰
	und	0,1984	» Casein = 3,94 ‰
	5,0274 gr. Milch gaben	0,0799	» Albumin = 1,58 ‰
Vom 12. I. 1899:	5,0697 » » »	0,6463	» Casein und Fett
	hierauf	0,4660	» Fett = 9,19 ‰
	und	0,1798	» Casein = 3,54 ‰
	5,0697 gr. Milch gaben	0,0780	» Albumin = 1,53 ‰
Vom 13. I. 1899:	5,0439 » » »	0,5297	» Casein und Fett
	hierauf	0,3638	» Fett = 7,21 ‰
	und	0,1658	» Casein = 3,28 ‰
	5,0439 gr. Milch gaben	0,0525	» Albumin = 1,04 ‰
Vom 14. I. 1899:	5,1907 » » »	0,6875	» Casein und Fett
	hierauf	0,5000	» Fett = 9,63 ‰
	und	0,1881	» Casein = 3,62 ‰
	5,1907 gr. Milch gaben	0,0782	» Albumin = 1,50 ‰
Vom 15. I. 1899:	4,9620 » » »	0,6655	» Casein und Fett
	hierauf	0,4512	» Fett = 9,09 ‰
	und	0,2148	» Casein = 4,32 ‰
	4,9620 gr. Milch gaben	0,0868	» Albumin = 1,74 ‰
Vom 16. I. 1899:	5,2324 » » »	0,7000	» Casein und Fett
	hierauf	0,4923	» Fett = 9,40 ‰
	und	0,2084	» Casein = 3,98 ‰
	5,2324 gr. Milch gaben	0,0700	» Albumin = 1,33 ‰

Vom 17. I. 1899:	4,8172 gr. Milch gaben	0,6012 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,4138	» Fett = 8,59 %
	und	0,1822	» Casein = 3,78 %
	4,8172 gr. Milch gaben	0,0575	» Albumin = 1,19 %
Vom 18. I. 1899:	5,0276	» 0,6073	» Casein und Fett
	hierauf	0,4396	» Fett = 8,74 %
	und	0,1513	» Casein = 3,00 %
	5,0276 gr. Milch gaben	0,0712	» Albumin = 1,41 %
Vom 19. I. 1899:	5,1071	» 0,8474	» Casein und Fett
	hierauf	0,6598	» Fett = 12,91 %
	und	0,1875	» Casein = 3,67 %
	5,1071 gr. Milch gaben	0,0745	» Albumin = 1,45 %
Vom 20. I. 1899:	5,2066	» 0,8500	» Casein und Fett
	hierauf	0,6496	» Fett = 12,47 %
	und	0,1958	» Casein = 3,76 %
	5,2066 gr. Milch gaben	0,0720	» Albumin = 1,38 %
Vom 21. I. 1899:	4,8077	» 0,8205	» Casein und Fett
	hierauf	0,6445	» Fett = 13,40 %
	und	0,1754	» Casein = 3,65 %
	4,8077 gr. Milch gaben	0,0666	» Albumin = 1,38 %
Vom 22. I. 1899:	5,1533	» 0,6912	» Casein und Fett
	hierauf	0,5396	» Fett = 10,47 %
	und	0,1516	» Casein = 2,94 %
	5,1533 gr. Milch gaben	0,0779	» Albumin = 1,51 %
Vom 23. I. 1899:	4,8851	» 0,7330	» Casein und Fett
	hierauf	0,5500	» Fett = 11,25 %
	und	0,1814	» Casein = 3,71 %
	4,8851 gr. Milch gaben	0,0563	» Albumin = 1,15 %
Vom 24. I. 1899:	3,9578	» 0,5190	» Casein und Fett
	hierauf	0,3967	» Fett = 10,02 %
	und	0,1223	» Casein = 3,09 %
	3,9578 gr. Milch gaben	0,0433	» Albumin = 1,09 %
Vom 25. I. 1899:	4,4456	» 0,7086	» Casein und Fett
	hierauf	0,5745	» Fett = 12,92 %
	und	0,1336	» Casein = 3,00 %
	4,4456 gr. Milch gaben	0,0629	» Albumin = 1,41 %
Vom 26. I. 1899:	6,1189	» 0,8525	» Casein und Fett
	hierauf	0,6600	» Fett = 10,78 %
	und	0,1922	» Casein = 3,14 %
	6,1189 gr. Milch gaben	0,0706	» Albumin = 1,15 %
Vom 27. I. 1899:	4,6000	» 0,7224	» Casein und Fett
	hierauf	0,5780	» Fett = 12,56 %
	und	0,1440	» Casein = 3,00 %
	4,6000 gr. Milch gaben	0,0650	» Albumin = 1,40 %

Vom 28. I. 1899:	4,4605 gr. Milch gaben	0,7000 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,5660	» Fett = 12,68%
	und	0,1330	» Casein = 2,98%
	4,4605 gr. Milch gaben	0,0621	» Albumin = 1,39%
Vom 29. I. 1899:	4,7221 » » »	0,7302	» Casein und Fett
	hierauf	0,5900	» Fett = 12,49%
	und	0,1400	» Casein = 2,96%
	4,7221 gr. Milch gaben	0,0640	» Albumin = 1,35%
Vom 30. I. 1899:	4,7299 » » »	0,7120	» Casein und Fett
	hierauf	0,5712	» Fett = 12,07%
	und	0,1382	» Casein = 2,92%
	4,7299 gr. Milch gaben	0,0630	» Albumin = 1,33%
Vom 31. I. 1899:	4,5222 » » »	0,7112	» Casein und Fett
	hierauf	0,5811	» Fett = 12,84%
	und	0,1311	» Casein = 2,89%
	4,5222 gr. Milch gaben	0,0610	» Albumin = 1,34%

Aschenanalysen.

Es wurden folgende Aschenanalysen ausgeführt:

I. Analyse der vom 10. I. — 22. I. 1899 gesammelten Milch:

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K ₂ O	0,0945 gr.
Na ₂ O	0,0776 »
Cl	0,0756 »
Fe ₂ O ₃	0,0040 »
CaO	0,2489 »
MgO	0,0157 »
P ₂ O ₅	0,3078 »
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8241 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0170 »
	<hr/> 0,8071 gr.

Zahlenbelege.

61,4582 gr. Milch gaben	0,1820 gr. KCl + NaCl
hierauf	0,3012 » K ₂ PtCl ₆
daraus berechnet	0,0920 » KCl = 0,0581 gr. K ₂ O = 0,0945%
und	0,0900 » NaCl = 0,0477 » Na ₂ O = 0,0776%
24,3326 gr. Milch gaben	0,0747 » AgCl = 0,0184 » Cl = 0,0756%
122,2891 » » »	0,0096 » Fe ₂ O ₃ , P ₂ O ₅

hieraus berechnet . . .	0,0051	gr. Fe_2O_3
und	0,0045	» P_2O_5
Durch Titration gefunden	0,0048	» Fe_2O_3
Im Mittel	0,0049	» $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0040\%$ Fe_2O_3 .
122,2891 gr. Milch gaben	0,3044	» $\text{CaO} = 0,2489\%$
122,2891 » »	0,0537	» $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0193$ gr. $\text{MgO} = 0,0157\%$
und	0,0343	» P_2O_5 .
122,2891 gr. Milch gaben	0,5280	» $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,3377$ gr. P_2O_5
	0,3765	» Gesamtmphosphorsäure $= 0,3078\%$

II. Analyse der nach der eingetretenen Gewichtsverdopplung bis zum Schluss der Melkungen gesammelten Milch (23. I. — 31. I. 1899).

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K_2O	0,0942	gr.
Na_2O	0,0756	»
Cl	0,0824	»
Fe_2O_3	0,0039	»
CaO	0,2402	»
MgO	0,0148	»
P_2O_5	0,2944	»
Summe der Aschenbestandtheile . .		0,8055 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors . .		0,0185 »
		<hr/> 0,7970 gr.

Analytische Belege.

61,3422 gr. Milch gaben	0,1791	gr. $\text{KCl} + \text{NaCl}$
hieraus	0,2998	» K_2PtCl_6
daraus berechnet . . .	0,0916	» $\text{KCl} = 0,0578$ gr. $\text{K}_2\text{O} = 0,0942\%$
und	0,0875	» $\text{NaCl} = 0,0464$ » $\text{Na}_2\text{O} = 0,0756\%$
25,2322 gr. Milch gaben	0,0842	» $\text{AgCl} = 0,0208$ » $\text{Cl} = 0,0824\%$
120,1264 » »	0,0092	» Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet . . .	0,0043	» P_2O_5
und	0,0049	gr. Fe_2O_3 .
durch Titration gefunden	0,0046	» Fe_2O_3 .
im Mittel:	0,0048	» $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0039\%$.
120,1264 gr. Milch gaben	0,2886	» $\text{CaO} = 0,2402\%$
120,1264 » »	0,0496	» $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0178$ gr. $\text{MgO} = 0,0148\%$
und	0,0317	» P_2O_5 .
120,1264 gr. Milch gaben	0,4968	gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,3177$ gr. P_2O_5 .
Gesamt-Phosphorsäure $0,3537$ gr. $= 0,2944\%$.		

Schwein II.

Zur Zeit der Geburt war das Mutterschwein ca. 2 Jahre alt. Dasselbe hatte vor diesem Wurf bereits zweimal Junge geworfen und zwar das erste Mal 9 und das zweite Mal 14 Junge. Der gewogene Wurf wurde am 17. I. 1899 geboren. Die Zahl der Jungen betrug 6. Von diesen 6 Jungen wurde ein einzelnes zur täglichen Wägung bestimmt. Ausserdem war am Tage der Geburt der ganze Wurf gewogen worden. Sobald das einzelne Thier sich der Verdopplung des Anfangsgewichtes näherte, wurde wiederum der ganze Wurf gewogen.

Gewichtsbestimmung.

A. Körpergewichtszunahme des Einzelthieres.

Das Gewicht des Einzelthieres betrug:

am 17. I. 1899 2000,0 gr.	am 23. I. 1899 4000,0 gr.
› 18. I. 1899 2300,0 ›	› 24. I. 1899 4275,0 ›
› 19. I. 1899 2650,0 ›	› 25. I. 1899 4325,0 ›
› 20. I. 1899 3000,0 ›	› 26. I. 1899 4650,0 ›
› 21. I. 1899 3375,0 ›	› 27. I. 1899 4950,0 ›
› 22. I. 1899 3725,0 ›	› 28. I. 1899 5200,0 ›

Das gewogene Einzelthier verdoppelte sein Anfangsgewicht in 6 Tagen.

B. Körpergewichtszunahme des ganzen Wurfes.

Das Gewicht des ganzen Wurfes betrug:

am 17. I. 1899 8750,0 gr.	am 26. I. 1899 21000,0 gr.
› 23. I. 1899 17420,0 ›	› 27. I. 1899 22000,0 ›
› 24. I. 1899 17700,0 ›	› 28. I. 1899 23500,0 ›

Der ganze Wurf verdoppelte sein Anfangsgewicht in 6½ Tagen.

Milchanalyse.

Auch hier wurden in den täglich gewonnenen Milchportionen sogleich die organischen Stoffe ermittelt. An der vom 18. I. 1899 — 24. I. 1899 und vom 25. I. 1899 — 29. I. 1899 gesammelten Milch wurden Aschenanalysen ausgeführt.

Die folgende Tabelle gibt einen Ueberblick über die Resultate der täglich vorgenommenen Bestimmungen des Caseins, Albumins, Fettes und Zuckers.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
18. I. 1899	3,69	2,96	6,65	10,50	2,86
19. I. 1899	3,00	1,09	4,09	5,93	3,12
20. I. 1899	3,12	1,88	5,00	5,67	3,66
21. I. 1899	3,26	1,31	4,57	6,20	3,54
22. I. 1899	3,22	1,03	4,25	5,45	3,68
23. I. 1899	3,53	1,08	4,61	9,07	3,12
24. I. 1899	3,00	1,53	4,53	6,87	4,12
25. I. 1899	3,30	1,05	4,35	7,08	3,86
26. I. 1899	3,35	1,00	4,35	7,21	3,76
27. I. 1899	3,21	1,01	4,22	6,96	3,98
28. I. 1899	3,23	1,00	4,23	10,71	3,22
29. I. 1899	2,93	1,09	4,02	10,32	3,18

Im Mittel vom 18. I. 1899 — 24. I. 1899:

Casein 3,26 ‰ }
 Albumin 1,55 ‰ } Summe 4,81 ‰
 Fett 7,09 ‰
 Zucker 3,44 ‰

Im Mittel vom 25. I. 1899 — 29. I. 1899:

Casein 3,20 ‰ }
 Albumin 1,03 ‰ } Summe 4,23 ‰
 Fett 8,45 ‰
 Zucker 3,60 ‰

Zahlenbelege.

Vom 18. I. 1899: 5,0767 gr. Milch gaben 0,7217 gr. Casein und Fett
 hieraus 0,5335 ‰ Fett = 10,50 ‰
 und 0,1877 ‰ Casein = 3,69 ‰
 5,0767 gr. Milch gaben 0,1504 ‰ Albumin = 2,96 ‰

Vom 19. I. 1899: 1,7981 ‰ ‰ ‰ 0,1617 ‰ Casein und Fett
 hieraus 0,1067 ‰ Fett = 5,93 ‰
 und 0,0540 ‰ Casein = 3,00 ‰
 1,7981 gr. Milch gaben 0,0197 ‰ Albumin = 1,09 ‰

Vom 20. I. 1899:	3,2800 gr. Milch gaben	0,2890	gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,1862	» Fett =	5,67 %
	und	0,1025	» Casein =	3,12 %
	3,2800 gr. Milch gaben	0,0618	» Albumin =	1,88 %
Vom 21. I. 1899:	5,0294 » » »	0,4775	» Casein und Fett	
	hierauf	0,3122	» Fett =	6,20 %
	und	0,1643	» Casein =	3,26 %
	5,0294 gr. Milch gaben	0,0660	» Albumin =	1,31 %
Vom 22. I. 1899:	3,5839 » » »	0,3100	» Casein und Fett	
	hierauf	0,1955	» Fett =	5,45 %
	und	0,1155	» Casein =	3,22 %
	3,5839 gr. Milch gaben	0,0372	» Albumin =	1,03 %
Vom 23. I. 1899:	4,2521 » » »	0,5365	» Casein und Fett	
	hierauf	0,3860	» Fett =	9,07 %
	und	0,1503	» Casein =	3,53 %
	4,2521 gr. Milch gaben	0,0463	» Albumin =	1,08 %
Vom 24. I. 1899:	3,9790 » » »	0,3937	» Casein und Fett	
	hierauf	0,2735	» Fett =	6,87 %
	und	0,1197	» Casein =	3,00 %
	3,9790 gr. Milch gaben	0,0612	» Albumin =	1,53 %
Vom 25. I. 1899:	4,3283 » » »	0,4500	» Casein und Fett	
	hierauf	0,3068	» Fett =	7,08 %
	und	0,1432	» Casein =	3,30 %
	4,3283 gr. Milch gaben	0,0455	» Albumin =	1,05 %
Vom 26. I. 1899:	4,2111 » » »	0,4411	» Casein und Fett	
	hierauf	0,3037	» Fett =	7,21 %
	und	0,1412	» Casein =	3,35 %
	4,2111 gr. Milch gaben	0,0422	» Albumin =	1,00 %
Vom 27. I. 1899:	4,4223 » » »	0,4501	» Casein und Fett	
	hierauf	0,3079	» Fett =	6,96 %
	und	0,1422	» Casein =	3,21 %
	4,4223 gr. Milch gaben	0,0450	» Albumin =	1,01 %
Vom 28. I. 1899:	4,2222 » » »	0,5895	» Casein und Fett	
	hierauf	0,4522	» Fett =	10,71 %
	und	0,1367	» Casein =	3,23 %
	4,2222 gr. Milch gaben	0,0423	» Albumin =	1,00 %
Vom 29. I. 1899:	4,1212 » » »	0,5511	» Casein und Fett	
	hierauf	0,4255	» Fett =	10,32 %
	und	0,1211	» Casein =	2,93 %
	4,1212 gr. Milch gaben	0,0452	» Albumin =	1,09 %

Aschenanalyse.

I. Analyse der vom 18. I. 1899 — 24. I. 1899 gesammelten Milch:

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K_2O	0,0987 gr.
Na_2O	0,0794 »
Cl	0,0797 »
Fe_2O_3	0,0043 »
CaO	0,2567 »
MgO	0,0163 »
P_2O_5	0,3149 »
Summe der Aschenbestandtheile	0,8500 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,0179 »
	<u>0,8321 gr.</u>

Analytische Belege.

60,5445 gr. Milch gaben 0,1854 gr. NaCl + KCl	
hieraus	0,3102 » K_2PtCl_6
daraus berechnet	0,0947 » KCl = 0,0598 gr. K_2O = 0,0987 %
und	0,0907 » NaCl = 0,0481 » Na_2O = 0,0794 »
25,3384 gr. Milch gaben 0,0821	AgCl = 0,0202 » Cl = 0,0797 »
120,1866 » » »	0,0102 » Fe_2O_3 , P_2O_5
hieraus berechnet	0,0047 » P_2O_5
und	0,0055 » Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0050 » Fe_2O_3
im Mittel	0,0052 » Fe_2O_3 = 0,0043 %
120,1866 gr. Milch gaben 0,3086	CaO = 0,2567 %
120,1866 » » »	0,0545 » $Mg_3P_2O_7$ = 0,0196 gr. MgO = 0,0163 %
und	0,0348 » P_2O_5
120,1866 gr. Milch gaben 0,5300	$Mg_3P_2O_7$ = 0,3390 gr. P_2O_5
Gesammtphosphorsäure . 0,3785	0,3149 % .

II. Analyse der vom 25. I. — 29. I. 1899
gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K_2O	0,0921 gr.
Na_2O	0,0743 »
Cl	0,0711 »
Fe_2O_3	0,0042 »
CaO	0,2378 »
MgO	0,0150 »
P_2O_5	0,2919 »
Summe der Aschenbestandtheile	0,7864 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,0160 »
	<u>0,7704 gr.</u>

Analytische Belege.

62,8468 gr. Milch gaben	0,1798 gr. KCl + NaCl	
hieraus	0,3002	» K_2PtCl_6
daraus berechnet	0,0917	» KCl = 0,0579 gr. K_2O = 0,0921 %
mit	0,0881	» NaCl = 0,0467 » Na_2O = 0,0743 »
25,4468 gr. Milch gaben	0,0736	» AgCl = 0,0181 » Cl = 0,0711 »
130,2468 » » »	0,0105	» Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet	0,0049	» P_2O_5
und	0,0056	» Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0054	» Fe_2O_3
im Mittel	0,0055	» Fe_2O_3 = 0,0042 %
130,2468 gr. Milch gaben	0,3108	» CaO = 0,2378 »
130,2468 » » »	0,0545	» $Mg_3P_2O_7$ = 0,0196 gr. MgO = 0,0150 %
und	0,0348	» P_2O_5
130,2468 gr. Milch gaben	0,5325	» $Mg_3P_2O_7$ = 0,3405 gr. P_2O_5
Gesamtposphorsäure . 0,3802		» = 0,2919 %.

Schwein III.

Zur Zeit der Geburt war das Mutterschwein ca. 2 Jahre alt. Dasselbe warf zum dritten Mal. Die beiden ersten Würfe hatten aus je 9 Thieren bestanden. Die Zahl der Jungen des dritten am 19. I. 1899 geborenen Wurfs betrug 14. Leider scheiterten bei diesem Thiere alle Melkungsversuche. Auch der ganze Wurf konnte nicht gewogen werden, dagegen ein einzelnes Thier.

Gewichtsbestimmungen.

Das zur Wägung bestimmte Thier wog:

am 19. I. 1899	2000,0 gr.
» 1. II. 1899	4050,0 »
» 2. II. 1899	4250,0 »
» 4. II. 1899	4500,0 »
» 6. II. 1899	4850,0 »

Das gewogene Schweinchen verdoppelte sein Anfangsgewicht am 1. II. 1899, also in 13 Tagen.

Schwein IV.

Zur Zeit der Geburt war das Mutterschwein ca. 2 Jahre alt. Die am 20. I. 1899 erfolgte Geburt war die dritte. Die

beiden ersten Würfe umfassten 6 und 10 Junge. Der dritte Wurf wies 12 Junge auf. Milch konnte keine erhalten werden, dagegen konnte hier der ganze Wurf gewogen werden.

Gewichtsbestimmung.

Das Gewicht des ganzen Wurfes betrug:

am 20. I. 1899	9 020,0 gr.	am 31. I. 1899	15 000,0 gr.
» 21. I. 1899	9 220,0 »	» 1. II. 1899	16 100,0 »
» 24. I. 1899	9 750,0 »	» 2. II. 1899	17 025,0 »
» 25. I. 1899	11 040,0 »	» 3. II. 1899	18 080,0 »
» 28. I. 1899	12 800,0 »	» 4. II. 1899	19 100,0 »
» 29. I. 1899	14 010,0 »		

Der ganze Wurf verdoppelte sein Anfangsgewicht in 14 Tagen.

Schwein V.

Das ca. 1 Jahr alte Thier warf am 19. III. 1899 acht Junge. Es war dies die erste Geburt desselben. Bei diesem Wurf gelang es, sämtliche Junge täglich zu wägen. Auch Milch konnte täglich in genügender Menge erhalten werden.

I. Gewichtsbestimmung.

Der ganze Wurf wog:

am 19. III. 1899	8500,0 gr.	am 27. III. 1899	18600,0 gr.
» 20. III. 1899	9100,0 »	» 28. III. 1899	20000,0 »
» 21. III. 1899	9900,0 »	» 29. III. 1899	21500,0 »
» 22. III. 1899	11500,0 »	» 30. III. 1899	23000,0 »
» 23. III. 1899	13000,0 »	» 31. III. 1899	24400,0 »
» 24. III. 1899	14500,0 »	» 1. IV. 1899	25700,0 »
» 25. III. 1899	16000,0 »	» 2. IV. 1899	27100,0 »
» 26. III. 1899	17500,0 »		

Der ganze Wurf verdoppelte sein Anfangsgewicht in 6 $\frac{1}{2}$ Tagen.

II. Milchanalysen.

Die folgende Tabelle gibt einen Ueberblick über die Resultate der täglich ausgeführten Bestimmungen des Casein-, Albumin-, Fett- und Zuckergehaltes der Schweinemilch.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
19. III. 1899	5,65	5,29	10,94	5,15	1,82
20. III. 1899	3,61	1,17	4,78	6,44	2,86
21. III. 1899	3,69	1,13	4,82	6,34	2,99
22. III. 1899	3,64	1,14	4,78	6,39	3,44
23. III. 1899	3,52	1,10	4,62	6,38	3,60
24. III. 1899	3,19	1,12	4,31	6,62	3,60
25. III. 1899	3,22	1,13	4,35	6,65	3,54
26. III. 1899	3,19	1,13	4,32	6,62	3,68
27. III. 1899	3,09	1,11	4,20	6,64	3,72
28. III. 1899	3,06	1,09	4,15	6,88	3,84
29. III. 1899	3,08	1,06	4,14	7,12	3,76
30. III. 1899	3,31	1,01	4,32	6,96	3,72
31. III. 1899	3,35	1,08	4,43	8,58	3,75
1. IV. 1899	3,69	1,03	4,72	7,15	3,60
2. IV. 1899	3,07	1,02	4,09	7,20	3,62

Mittel aus den vom 19. III. — 26. III. ausgeführten Bestimmungen:

Casein	3,71%	} Summe 5,86%
Albumin	1,65%	
Fett	6,82%	
Zucker	3,19%	

Mittel aus den vom 27. III. — 2. IV. ausgeführten Analysen:

Casein	3,23%	} Summe 4,29%
Albumin	1,06%	
Fett	7,22%	
Zucker	3,71%	

Zahlenbelege.

Vom 19. III. 1899: 22,1435 gr. Milch gaben 2,3930 gr. Casein und Fett
hierauf 1,1408 » Fett = 5,15%
und 1,2520 » Casein = 5,65%
22,1435 gr. Milch gaben 1,1715 » Albumin = 5,29%

Vom 20. III. 1899:	9,7224 gr. Milch gaben	0,9782 gr. Casein und Fett	
	hieraus	0,6262	» Fett = 6,44%
	und	0,3510	» Casein = 3,61%
	9,7224 gr. Milch gaben	0,1145	» Albumin = 1,17%
Vom 21. III. 1899:	9,7220 » » »	0,9760	» Casein und Fett
	hieraus	0,6166	» Fett = 6,34%
	und	0,3591	» Casein = 3,69%
	9,7220 gr. Milch gaben	0,1100	» Albumin = 1,13%
Vom 22. III. 1899:	9,7211 » » »	0,9766	» Casein und Fett
	hieraus	0,6222	» Fett = 6,39%
	und	0,3543	» Casein = 3,64%
	9,7211 gr. Milch gaben	0,1110	» Albumin = 1,14%
Vom 23. III. 1899:	9,6910 » » »	0,9620	» Casein und Fett
	hieraus	0,6190	» Fett = 6,38%
	und	0,3420	» Casein = 3,52%
	9,6910 gr. Milch gaben	0,1066	» Albumin = 1,10%
Vom 24. III. 1899:	9,7220 » » »	0,9550	» Casein und Fett
	hieraus	0,6440	» Fett = 6,62%
	und	0,3110	» Casein = 3,19%
	9,7220 gr. Milch gaben	0,1098	» Albumin = 1,12%
Vom 25. III. 1899:	9,7402 » » »	0,9622	» Casein und Fett
	hieraus	0,6482	» Fett = 6,65%
	und	0,3142	» Casein = 3,22%
	9,7402 gr. Milch gaben	0,1102	» Albumin = 1,13%
Vom 26. III. 1899:	9,7219 » » »	0,9545	» Casein und Fett
	hieraus	0,6445	» Fett = 6,62%
	und	0,3101	» Casein = 3,19%
	9,7219 gr. Milch gaben	0,1100	» Albumin = 1,13%
Vom 27. III. 1899:	9,6986 » » »	0,9446	» Casein und Fett
	hieraus	0,6440	» Fett = 6,64%
	und	0,3000	» Casein = 3,09%
	9,6986 gr. Milch gaben	0,1082	» Albumin = 1,11%
Vom 28. III. 1899:	9,7112 » » »	0,9668	» Casein und Fett
	hieraus	0,6688	» Fett = 6,88%
	und	0,2980	» Casein = 3,06%
	9,7112 gr. Milch gaben	0,1066	» Albumin = 1,09%
Vom 29. III. 1899:	10,2236 » » »	1,0446	» Casein und Fett
	hieraus	0,7286	» Fett = 7,12%
	und	0,3158	» Casein = 3,08%
	10,2236 gr. Milch gaben	0,1086	» Albumin = 1,06%
Vom 30. III. 1899:	10,1023 » » »	1,0396	» Casein und Fett
	hieraus	0,7034	» Fett = 6,96%
	und	0,3352	» Casein = 3,31%
	10,1023 gr. Milch gaben	0,1022	» Albumin = 1,01%

Vom 31. III. 1899:	10,3466 gr. Milch gaben	1,2366 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,8886 » Fett	= 8,58%
	und	0,3472 » Casein	= 3,35%
	10,3466 gr. Milch gaben	0,1132 » Albumin	= 1,08%
Vom 1. IV. 1899:	10,0022 » » »	1,0862 » Casein und Fett	
	hierauf	0,7154 » Fett	= 7,15%
	und	0,3699 » Casein	= 3,69%
	10,0022 gr. Milch gaben	0,1032 » Albumin	= 1,03%
Vom 2. IV. 1899:	9,7220 » » »	0,9998 » Casein und Fett	
	hierauf	0,7002 » Fett	= 7,20%
	und	0,2992 » Casein	= 3,07%
	9,7220 gr. Milch gaben	0,1000 » Albumin	= 1,02%

Aschenanalysen.

I. Aschenanalyse der vom 19. III.—26. III. täglich gesammelten Milch:

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K ₂ O	0,1055 gr.
Na ₂ O	0,0828 »
Cl	0,0835 »
Fe ₂ O ₃	0,0044 »
CaO	0,2675 »
MgO	0,0172 »
P ₂ O ₅	0,3290 »
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8899 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0188 »
	<hr/> 0,8711 gr.

Analytische Belege.

56,3687 gr. Milch gaben	0,1824 gr. NaCl + KCl
hierauf	0,3086 » K ₂ PtCl ₆
daraus berechnet . . .	0,0943 » KCl = 0,0595 gr. K ₂ O = 0,1055%
und	0,0881 » NaCl = 0,0467 » Na ₂ O = 0,0828%
25,0286 gr. Milch gaben	0,0846 » AgCl = 0,0209 » Cl = 0,0835%
115,8622 » » »	0,0096 » Fe ₂ O ₃ , P ₂ O ₅
hierauf berechnet . . .	0,0045 » P ₂ O ₅
	<hr/> 0,0051 gr. Fe ₂ O ₃
durch Titration gefunden	0,0049 » Fe ₂ O ₃
im Mittel	0,0050 » Fe ₂ O ₃ = 0,0044%
115,8622 gr. Milch gaben	0,3100 » CaO = 0,2675%
115,8622 » » »	0,0556 » Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,0200 gr. Mg = 0,0172%
und	0,0355 » P ₂ O ₅
115,8622 gr. Milch gaben	0,5335 » Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,3412 gr. P ₂ O ₅
Gesamttphosphorsäure = 0,3812	» = 0,3290%.

II. Analyse der vom 27. III.—2. IV. täglich gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schweinemilch enthalten:

K ₂ O	0,0985 gr.
Na ₂ O	0,0739 „
Cl	0,0673 „
Fe ₂ O ₃	0,0042 „
CaO	0,2406 „
MgO	0,0144 „
P ₂ O ₅	0,3000 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,7989 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0151 „
	<hr/> 0,7838 gr.

Analytische Belege.

60,8533 gr. Milch gaben	0,1800 gr. KCl + NaCl
hieraus	0,3110 „ K ₂ PtCl ₆
daraus berechnet . . .	0,0950 „ KCl = 0,0600 gr. K ₂ O = 0,0985 %
und	0,0850 „ NaCl = 0,0450 „ Na ₂ O = 0,0739 %
26,4223 gr. Milch gaben	0,0722 „ AgCl = 0,0178 „ Cl = 0,0673 %
125,0022 „ „ „	0,0101 „ F ₂ O ₃ + P ₂ O ₅
daraus berechnet . . .	0,0047 „ P ₂ O ₅
und	0,0054 gr. Fe ₂ O ₃ .
durch Titration gefunden	0,0052 „ Fe ₂ O ₃
im Mittel	0,0053 „ Fe ₂ O ₃ = 0,0042 %
125,0022 gr. Milch gaben	0,3008 „ CaO = 0,2406 %
125,0022 „ „ „	0,0504 „ Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,0181 gr. MgO = 0,0144 %
und	0,0322 „ P ₂ O ₅
125,0022 gr. Milch gaben	0,5289 „ Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,3382 gr. P ₂ O ₅
Gesammtphosphorsäure =	0,3751 „ = 0,3000 %

III. Schaf.

Beim Schaf verfüge ich über eine Bestimmung der Zeit, in welcher das Anfangsgewicht des Wurfes sich verdoppelte, ferner über tägliche Analysen der Milch von demselben Thier, dessen Wurf gewogen wurde.

I. Gewichtsbestimmung.

Das Mutterschaf war zur Zeit der Geburt ca. 1 Jahr alt Die am 8. II. 1899 (Abends 6 Uhr) erfolgte Geburt war die erste dieses Thieres. Der Wurf umfasste ein Thier. Die erste Wägung fand am 9. II. 1899 (Morgens 8 Uhr) statt.

Gewicht des Jungen:

am 9. II. 1899 4000,0 gr.	am 20. II. 1899 6900,0 gr.
„ 10. II. 1899 4250,0 „	„ 21. II. 1899 7300,0 „
„ 11. II. 1899 4750,0 „	„ 22. II. 1899 7500,0 „
„ 12. II. 1899 5250,0 „	„ 23. II. 1899 7750,0 „
„ 13. II. 1899 5300,0 „	„ 24. II. 1899 8000,0 „
„ 14. II. 1899 5500,0 „	„ 25. II. 1899 8250,0 „
„ 15. II. 1899 5725,0 „	„ 26. II. 1899 8450,0 „
„ 16. II. 1899 5900,0 „	„ 27. II. 1899 8500,0 „
„ 17. II. 1899 6000,0 „	„ 28. II. 1899 9000,0 „
„ 18. II. 1899 6525,0 „	„ 1. III. 1899 9250,0 „
„ 19. II. 1899 6725,0 „	„ 2. III. 1899 9500,0 „

Die Verdoppelung des Anfangsgewichtes erfolgte am 24. II. 1899, also in 15 Tagen.

Milchanalysen.

Von demselben Thier, dessen Junges zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit verwendet wurde, wurde täglich Milch gesammelt. Die Gewinnung derselben war eine sehr leichte. Täglich wurde der Casein-, Albumin-, Fett- und Zuckergehalt derselben bestimmt. Ausserdem wurde von jedem Tage von der Geburt an bis zum 2. III. Milch zur Aschenanalyse verwendet.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Resultate der täglichen Bestimmungen von Casein, Albumin, Fett und Zucker.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe Casein und Albumin	Fett	Zucker
9. II. 1899	4,67	1,92	6,59	10,94	4,25
10. II. 1899	4,50	1,04	5,54	8,64	4,82
11. II. 1899	4,09	0,65	4,74	13,13	4,96
12. II. 1899	3,80	0,35	4,15	9,37	5,00
13. II. 1899	3,89	0,97	4,86	7,70	5,12
14. II. 1899	3,69	0,64	4,33	8,61	5,19
15. II. 1899	4,15	0,83	4,98	8,13	5,05
16. II. 1899	4,07	0,90	4,97	8,85	5,21

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe Casein und Albumin	Fett	Zucker
17. II. 1899	3,89	0,53	4,42	9,23	5,20
18. II. 1899	3,84	0,68	4,52	8,78	5,20
19. II. 1899	3,99	0,49	4,48	9,09	5,28
20. II. 1899	4,07	0,84	4,91	9,84	5,31
21. II. 1899	4,00	0,72	4,72	6,57	5,30
22. II. 1899	4,12	0,90	5,02	7,74	5,42
23. II. 1899	4,43	0,90	5,33	12,48	4,22
24. II. 1899	4,16	0,52	4,68	9,46	5,12
25. II. 1899	4,27	0,54	4,81	9,13	5,22
26. II. 1899	4,04	0,53	4,57	9,46	5,41
27. II. 1899	4,04	0,53	4,57	9,57	5,14
28. II. 1899	4,02	0,53	4,55	9,59	5,16
1. III. 1899	4,05	0,51	4,56	9,46	5,25
2. III. 1899	3,98	0,52	4,50	9,43	5,16

Das Mittel aus den vom 9. II.—24. II. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,08 ‰	} Summe 4,88 ‰
Albumin	0,80 ‰	
Fett	9,29 ‰	
Zucker	5,04 ‰	

Das Mittel aus den vom 25. II. bis 2. III. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,07 ‰	} Summe 4,59 ‰
Albumin	0,52 ‰	
Fett	9,44 ‰	
Zucker	5,22 ‰	

Zahlenbelege.

Vom 9. II. 1899:	8,8550 gr. Milch gaben 1,3837 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,9692 > Fett = 10,94 ‰
	und	0,4143 > Casein = 4,67 ‰
	8,8550 gr. Milch gaben 0,1706	> Albumin = 1,92 ‰
Vom 10. II. 1899:	8,4002 „ „ „ 1,1049	> Casein und Fett
	hierauf	0,7260 > Fett = 8,64 ‰
	und	0,3783 > Casein = 4,50 ‰
	8,4002 gr. Milch gaben 0,0877	> Albumin = 1,04 ‰

Vom 11. II. 1899:	6,4722 gr. Milch gaben	1,1157 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,8500	» Fett = 13,13 %
	und	0,2650	» Casein = 4,09 %
	6,4722 gr. Milch gaben	0,0426	» Albumin = 0,65 %
Vom 12. II. 1899:	8,1301 » » »	1,0760	» Casein und Fett
	hierauf	0,7622	» Fett = 9,37 %
	und	0,3094	» Casein = 3,80 %
	8,1301 gr. Milch gaben	0,0285	» Albumin = 0,35 %
Vom 13. II. 1899:	6,4854 » » »	0,7535	» Casein und Fett
	hierauf	0,5000	» Fett = 7,70 %
	und	0,2524	» Casein = 3,99 %
	6,4854 gr. Milch gaben	0,0632	» Albumin = 0,97 %
Vom 14. II. 1899:	7,6283 » » »	0,9408	» Casein und Fett
	hierauf	0,6569	» Fett = 8,61 %
	und	0,2816	» Casein = 3,69 %
	7,6283 gr. Milch gaben	0,0493	» Albumin = 0,64 %
Vom 15. II. 1899:	7,5239 » » »	0,9250	» Casein und Fett
	hierauf	0,6120	» Fett = 8,13 %
	und	0,3129	» Casein = 4,15 %
	7,5239 gr. Milch gaben	0,0627	» Albumin = 0,83 %
Vom 16. II. 1899:	7,7618 » » »	1,0039	» Casein und Fett
	hierauf	0,6870	» Fett = 8,85 %
	und	0,3161	» Casein = 4,07 %
	7,7618 gr. Milch gaben	0,0700	» Albumin = 0,90 %
Vom 17. II. 1899:	7,9292 » » »	1,0468	» Casein und Fett
	hierauf	0,7320	» Fett = 9,23 %
	und	0,3088	» Casein = 3,89 %
	7,9292 gr. Milch gaben	0,0427	» Albumin = 0,53 %
Vom 18. II. 1899:	6,8882 » » »	0,8705	» Casein und Fett
	hierauf	0,6050	» Fett = 8,78 %
	und	0,2648	» Casein = 3,84 %
	6,8882 gr. Milch gaben	0,0473	» Albumin = 0,68 %
Vom 19. II. 1899:	9,4558 » » »	1,2389	» Casein und Fett
	hierauf	0,8600	» Fett = 9,09 %
	und	0,3782	» Casein = 3,99 %
	9,4558 gr. Milch gaben	0,0470	» Albumin = 0,49 %
Vom 20. II. 1899:	8,5348 » » »	1,2825	» Casein und Fett
	hierauf	0,8400	» Fett = 9,84 %
	und	0,3473	» Casein = 4,07 %
	8,5348 gr. Milch gaben	0,0717	» Albumin = 0,84 %
Vom 21. II. 1899:	8,5346 » » »	0,9030	» Casein und Fett
	hierauf	0,5610	» Fett = 6,57 %
	und	0,3414	» Casein = 4,00 %
	8,5346 gr. Milch gaben	0,0616	» Albumin = 0,72 %

Vom 22. II. 1899:	10,2196 gr. Milch gaben	1,2125 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,7914	» Fett = 7,74%
	und	0,4211	» Casein = 4,12%
	10,2196 gr. Milch gaben	0,0920	» Albumin = 0,90%
Vom 23. II. 1896:	11,0112 » » »	1,8685	» Casein und Fett
	hierauf	1,3744	» Fett = 12,48%
	und	0,4881	» Casein = 4,43%
	11,0112 gr. Milch gaben	0,1001	» Albumin = 0,90%
Vom 24. II. 1899:	9,6093 » » »	1,3112	» Casein und Fett
	hierauf	0,9108	» Fett = 9,46%
	und	0,4002	» Casein = 4,16%
	9,6093 gr. Milch gaben	0,0500	» Albumin = 0,52%
Vom 25. II. 1899:	9,5996 » » »	1,2890	» Casein und Fett
	hierauf	0,8768	» Fett = 9,13%
	und	0,4102	» Casein = 4,27%
	9,5996 gr. Milch gaben	0,0521	» Albumin = 0,54%
Vom 26. II. 1899:	9,6117 » » »	1,3001	» Casein und Fett
	hierauf	0,9100	» Fett = 9,46%
	und	0,3889	» Casein = 4,04%
	9,6117 gr. Milch gaben	0,0511	» Albumin = 0,53%
Vom 27. II. 1899:	9,6118 » » »	1,3095	» Casein und Fett
	hierauf	0,9200	» Fett = 9,57%
	und	0,3890	» Casein = 4,04%
	9,6118 gr. Milch gaben	0,0510	» Albumin = 0,53%
Vom 28. II. 1899:	9,7123 » » »	1,3233	» Casein und Fett
	hierauf	0,9322	» Fett = 9,59%
	und	0,3910	» Casein = 4,02%
	9,7123 gr. Milch gaben	0,0523	» Albumin = 0,53%
Vom 1. III. 1899:	9,6222 » » »	1,3010	» Casein und Fett
	hierauf	0,9112	» Fett = 9,46%
	und	0,3898	» Casein = 4,05%
	9,6222 gr. Milch gaben	0,0500	» Albumin = 0,51%
Vom 2. III. 1899:	9,5366 » » »	1,2803	» Casein und Fett
	hierauf	0,9001	» Fett = 9,43%
	und	0,3800	» Casein = 3,98%
	9,5366 gr. Milch gaben	0,0496	» Albumin = 0,52%

Aschenanalysen.

I. Aschenanalyse der vom 9. II.—13. II. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten:

K_2O	0,1001 gr.
Na_2O	0,0890 „
Cl	0,1340 „
Fe_2O_3	0,0039 „
CaO	0,2522 „
MgO	0,0154 „
P_2O_5	0,3004 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8950 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0302 „
	<u>0,8648 gr.</u>

Analytische Belege.

51,2232 gr. Milch gaben	0,1673 gr. KCl + NaCl
hieraus	0,2661 „ K_2PtCl_6
daraus berechnet . . .	0,0813 „ KCl = 0,0513 gr. K_2O = 0,1001 %
und	0,0860 „ NaCl = 0,0456 „ Na_2O = 0,0890 %
34,1002 gr. Milch gaben	0,1849 „ AgCl = 0,0457 „ Cl = 0,1340 %
100,5236 „ „ „	0,0089 „ Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet . . .	0,0041 „ P_2O_5
	<u>0,0048 gr. Fe_2O_3</u>
durch Titration gefunden	0,0032 „ Fe_2O_3
im Mittel	0,0040 „ Fe_2O_3 = 0,0039 %
100,5236 gr. Milch gaben	0,2536 „ CaO = 0,2522 %
100,5236 „ „ „	0,0431 „ $Mg_2P_2O_7$ = 0,0155 gr. MgO = 0,0154 %
und	0,0275 „ P_2O_5
100,5236 gr. Milch gaben	0,4229 „ $Mg_2P_2O_7$ = 0,2704 gr. P_2O_5
Gesamtmphosphorsäure = 0,3020	„ = 0,3004 %

II. Aschenanalyse der vom 14. II.—19. II.
gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten:

K_2O	0,0981 gr.
Na_2O	0,0891 „
Cl	0,1304 „
Fe_2O_3	0,0042 „
CaO	0,2480 „
MgO	0,0147 „
P_2O_5	0,2930 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8775 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0294 „
	<u>0,8481 gr.</u>

Analytische Belege.

50,2236 gr. Milch gaben	0,1626 gr. KCl+NaCl.	
hieraus	0,2558	» K_2PtCl_6
daraus berechnet	0,0781	» KCl = 0,0493 gr. K_2O = 0,0981 %
und	0,0845	» NaCl = 0,0448 » Na_2O = 0,0891
17,0236 gr. Milch gaben	0,0901	» AgCl = 0,0222 » Cl = 0,1304
100,2242 » Milch gaben	0,0085	» Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet	0,0039	» P_2O_5
	0,0046	» Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0042	» Fe_2O_3
im Mittel	0,0043	» Fe_2O_3 = 0,0042 %
100,2242 gr. Milch gaben	0,2486	» CaO = 0,2480
100,2242 » Milch gaben	0,0412	» $Mg_3P_2O_7$ = 0,0148 gr. MgO = 0,0147 %
und	0,0263	» P_2O_5
100,2242 gr. Milch gaben	0,4122	» $Mg_3P_2O_7$ = 0,2636 gr. P_2O_5
Gesammtphosphorsäure	0,2938	» = 0,2930 %

III. Aschenanalyse der vom 20. II.—24. II. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten:

K_2O	0,0919 gr.
Na_2O	0,0810 »
Cl	0,1248 »
Fe_2O_3	0,0041 »
CaO	0,2358 »
MgO	0,0143 »
P_2O_5	0,2850 »
Summe der Aschenbestandtheile	0,8369 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,0281 »
	0,8088 gr.

Analytische Belege.

51,3342 gr. Milch gaben	0,1533 gr. NaCl+KCl	
hieraus	0,2450	» K_2PtCl_6
daraus berechnet	0,0748	» KCl = 0,0472 gr. K_2O = 0,0919 %
und	0,0785	» NaCl = 0,0416 » Na_2O = 0,0810
18,0212 gr. Milch gaben	0,0912	» AgCl = 0,0225 » Cl = 0,1248
50,1234 » Milch gaben	0,0041	» Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet	0,0019	» P_2O_5
	0,0022	» Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0021	» Fe_2O_3
im Mittel	0,0021	» Fe_2O_3 = 0,0041 %
50,1234 gr. Milch gaben	0,1182	» CaO = 0,2358

50,1234 gr. Milch gaben 0,0201 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0072$ gr. $\text{MgO} = 0,0143\%$
 und 0,0128 > P_2O_5
 50,1234 gr. Milch gaben 0,2005 > $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,1282$ gr. P_2O_5
 Gesamtmphosphorsäure = 0,1429 > = 0,2850 %.

Das Mittel der drei Aschenanalysen, die Milch von der Geburt (9. II.) an bis zur eingetretenen Verdoppelung des Anfangsgewichts des Jungen (24. II.) umfassend, ergibt:

100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten:

K_2O	0,0967 gr.
Na_2O	0,0864 >
Cl	0,1297 >
Fe_2O_3	0,0041 >
CaO	0,2453 >
MgO	0,0148 >
P_2O_5	0,2928 >
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8698 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0292 >
	<hr/> 0,8406 gr.

IV. Aschenanalyse der vom 25. II.—2. III. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Schafmilch enthalten:

K_2O	0,0956 gr.
Na_2O	0,0847 >
Cl	0,1213 >
Fe_2O_3	0,0044 >
CaO	0,2350 >
MgO	0,0147 >
P_2O_5	0,2810 >
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8367 gr.
Sauerstoffäquivalent des Clors .	0,0273 >
	<hr/> 0,8094 gr.

Analytische Belege.

49,4522 gr. Milch gaben 0,1540 gr. $\text{KCl} + \text{NaCl}$
 hieraus 0,2458 > K_2PtCl_6
 daraus berechnet . . . 0,0750 > $\text{KCl} = 0,0473$ gr. $\text{K}_2\text{O} = 0,0956\%$
 und 0,0790 > $\text{NaCl} = 0,0419$ > $\text{Na}_2\text{O} = 0,0847$ >
 20,0288 gr. Milch gaben 0,0986 > $\text{AgCl} = 0,0243$ > $\text{Cl} = 0,1213$ >
 51,4862 > > > 0,0046 > Fe_2O_3 , P_2O_5
 daraus berechnet . . . 0,0021 > P_2O_5
 0,0025 gr. Fe_2O_3

durch Titration erhalten 0,0021 gr. Fe_2O_3
im Mittel 0,0023 > $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0044 \%$
51,4862 gr. Milch gaben 0,1210 > $\text{CaO} = 0,2350 \%$
51,4862 „ „ „ 0,0212 > $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0076$ gr. $\text{MgO} = 0,0147 \%$
und 0,0135 > P_2O_5
51,4862 gr. Milch gaben 0,2020 > $\text{M}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,1291$ gr. P_2O_5
Gesamtmphosphorsäure 0,1447 > = 0,2810 %.

IV. Ziege.

Bei der Ziege wurde gleichfalls von demselben Thiere, dessen Wurf täglich gewogen wurde, bis über die Verdoppelung des Anfangsgewichtes desselben hinaus, täglich Milch gesammelt. In derselben wurden täglich die Eiweissstoffe, das Fett und der Zucker bestimmt. Der nicht zu diesen Bestimmungen verwendete Theil der Milch wurde gesammelt und zur Aschenanalyse verwendet.

I. Gewichtsbestimmungen.

Das zu diesen Bestimmungen verwendete Junge wurde am 3. III. 1899 geworfen. Zur Zeit der Geburt war die Mutter 4 Jahre alt.

Das Junge wog:

am 3. III. 1899 3600,0 gr.	am 16. III. 1899 5600,0 gr.
„ 4. III. 1899 3550,0 „	„ 17. III. 1899 5850,0 „
„ 5. III. 1899 3650,0 „	„ 18. III. 1899 6225,0 „
„ 6. III. 1899 3800,0 „	„ 19. III. 1899 6300,0 „
„ 7. III. 1899 4100,0 „	„ 20. III. 1899 6450,0 „
„ 8. III. 1899 4300,0 „	„ 21. III. 1899 6500,0 „
„ 9. III. 1899 4550,0 „	„ 22. III. 1899 6600,0 „
„ 10. III. 1899 4575,0 „	„ 23. III. 1899 6800,0 „
„ 11. III. 1899 4700,0 „	„ 24. III. 1899 7000,0 „
„ 12. III. 1899 4795,0 „	„ 25. III. 1899 7250,0 „
„ 13. III. 1899 4875,0 „	„ 26. III. 1899 7400,0 „
„ 14. III. 1899 5100,0 „	„ 27. III. 1899 7750,0 „
„ 15. III. 1899 5400,0 „	

Die Verdoppelung des Anfangsgewichts des Jungen trat am 25. III. ein, also in 22 Tagen.

II. Milch-Analysen.

Die folgende Tabelle gibt einen Ueberblick über die

täglich ausgeführten Bestimmungen der Eiweissstoffe, des Fettes und des Zuckers.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
3. III. 1899	4,45	2,74	7,19	13,36	3,20
4. III. 1899	2,69	1,16	3,85	6,23	3,25
5. III. 1899	3,04	0,54	3,58	4,05	3,40
6. III. 1899	2,67	1,13	3,80	7,69	3,42
7. III. 1899	3,02	1,01	4,03	3,12	3,45
8. III. 1899	3,31	0,19	3,50	3,31	3,50
9. III. 1899	2,68	1,26	3,94	3,88	3,48
10. III. 1899	2,74	0,76	3,50	5,82	3,46
11. III. 1899	2,34	0,83	3,17	5,11	3,50
12. III. 1899	2,82	0,60	3,42	5,44	3,65
13. III. 1899	2,77	0,70	3,47	5,16	3,75
14. III. 1899	2,47	0,58	3,05	3,36	3,80
15. III. 1899	2,66	0,42	3,08	4,82	3,75
16. III. 1899	3,10	0,46	3,56	4,83	3,75
17. III. 1899	2,57	0,53	3,10	4,81	3,75
18. III. 1899	2,55	0,52	3,07	2,41	3,62
19. III. 1899	3,14	0,48	3,62	2,44	3,66
20. III. 1899	3,12	0,53	3,65	2,38	3,68
21. III. 1899	3,05	0,58	3,63	2,48	3,78
22. III. 1899	3,28	0,60	3,88	2,25	2,72
23. III. 1899	3,14	0,61	3,75	2,14	3,80
24. III. 1899	2,89	0,61	3,50	2,14	3,82
25. III. 1899	2,61	0,65	3,26	2,39	3,88
26. III. 1899	2,53	0,60	3,13	2,42	3,90
27. III. 1899	2,59	0,57	3,16	3,45	3,95

Das Mittel aus den vom 3. III. — 25. III. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	2,91%	} 3,67% Eiweiss.
Albumin	0,76%	
Fett	4,33%	
Zucker	3,61%	

Das Mittel aus den vom 26. III. — 27. III. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	2,56%	} 3,14% Eiweiss.
Albumin	0,58%	
Fett	2,93%	
Zucker	3,92%	

Zahlenbelege.

Vom 3. III. 1899:	13,9375 gr. Milch gaben	2,4860 gr. Casein und Fett
	daraus	1,8622 » Fett = 13,36%
	und	0,6212 » Casein = 4,45%
	13,9375 gr. Milch gaben	0,3823 » Albumin = 2,74%
Vom 4. III. 1899:	15,5820 » » »	1,3947 » Casein und Fett
	daraus	0,9723 » Fett = 6,23%
	und	0,4198 » Casein = 2,69%
	15,5820 gr. Milch gaben	0,1813 » Albumin = 1,16%
Vom 5. III. 1899:	12,2487 » » »	0,8705 » Casein und Fett
	daraus	0,4962 » Fett = 4,05%
	und	0,3732 » Casein = 3,04%
	12,2487 gr. Milch gaben	0,0671 » Albumin = 0,54%
Vom 6. III. 1899:	15,3095 » » »	1,5888 » Casein und Fett
	daraus	1,1788 » Fett = 7,69%
	und	0,4099 » Casein = 2,67%
	15,3095 gr. Milch gaben	0,1733 » Albumin = 1,13%
Vom 7. III. 1899:	13,4398 » » »	0,8271 » Casein und Fett
	daraus	0,4200 » Fett = 3,12%
	und	0,4066 » Casein = 3,02%
	13,4398 gr. Milch gaben	0,1362 » Albumin = 1,01%
Vom 8. III. 1899:	12,2905 » » »	0,8167 » Casein und Fett
	daraus	0,4080 » Fett = 3,31%
	und	0,4080 » Casein = 3,31%
	12,2905 gr. Milch gaben	0,0239 » Albumin = 0,19%
Vom 9. III. 1899:	16,2025 » » »	1,0643 » Casein und Fett
	daraus	0,6291 » Fett = 3,88%
	und	0,4348 » Casein = 2,68%
	16,2025 gr. Milch gaben	0,2056 » Albumin = 1,26%
Vom 10. III. 1899:	18,0003 » » »	1,5416 » Casein und Fett
	daraus	1,0482 » Fett = 5,82%
	und	0,4934 » Casein = 2,74%
	18,0003 gr. Milch gaben	0,1380 » Albumin = 0,76%
Vom 11. III. 1899:	17,6023 » » »	1,3125 » Casein und Fett
	daraus	0,9006 » Fett = 5,11%
	und	0,4125 » Casein = 2,34%
	17,6023 gr. Milch gaben	0,1475 » Albumin = 0,83%

Vom 12. III. 1899:	12,1323 gr. Milch gaben	1,0059 gr. Casein und Fett	
	daraus	0,6601	» Fett = 5,44%
	und	0,3425	» Casein = 2,82%
	12,1323 gr. Milch gaben	0,0729	» Albumin = 0,60%
Vom 13. III. 1899:	11,4650 » » »	0,9112	» Casein und Fett
	daraus	0,5922	» Fett = 5,16%
	und	0,3180	» Casein = 2,77%
	11,4650 gr. Milch gaben	0,0803	» Albumin = 0,70%
Vom 14. III. 1899:	20,7897 » » »	1,2152	» Casein und Fett
	daraus	0,7003	» Fett = 3,36%
	und	0,5151	» Casein = 2,47%
	20,7897 gr. Milch gaben	0,1218	» Albumin = 0,58%
Vom 15. III. 1899:	18,8800 » » »	1,4135	» Casein und Fett
	daraus	0,9112	» Fett = 4,82%
	und	0,5022	» Casein = 2,66%
	18,8800 gr. Milch gaben	0,0811	» Albumin = 0,42%
Vom 16. III. 1899:	23,2046 » » »	1,8435	» Casein und Fett
	daraus	1,1221	» Fett = 4,83%
	und	0,7211	» Casein = 3,10%
	23,2046 gr. Milch gaben	0,1090	» Albumin = 0,46%
Vom 17. III. 1899:	21,8135 » » »	1,6155	» Casein und Fett
	daraus	1,0510	» Fett = 4,81%
	und	0,5620	» Casein = 2,57%
	21,8135 gr. Milch gaben	0,1175	» Albumin = 0,53%
Vom 18. III. 1899:	20,6127 » » »	1,0265	» Casein und Fett
	daraus	0,4982	» Fett = 2,41%
	und	0,5270	» Casein = 2,55%
	20,6127 gr. Milch gaben	0,1081	» Albumin = 0,52%
Vom 19. III. 1899:	22,9868 » » »	1,2842	» Casein und Fett
	daraus	0,5622	» Fett = 2,44%
	und	0,7220	» Casein = 3,14%
	22,9868 gr. Milch gaben	0,1104	» Albumin = 0,48%
Vom 20. III. 1899:	28,5077 » » »	1,5730	» Casein und Fett
	daraus	0,6800	» Fett = 2,38%
	und	0,8920	» Casein = 3,12%
	28,5077 gr. Milch gaben	0,1516	» Albumin = 0,53%
Vom 21. III. 1899:	29,5060 » » »	1,6340	» Casein und Fett
	daraus	0,7332	» Fett = 2,48%
	und	0,9005	» Casein = 3,05%
	29,5060 gr. Milch gaben	0,1722	» Albumin = 0,58%
Vom 22. III. 1899:	26,2635 » » »	1,4547	» Casein und Fett
	daraus	0,5926	» Fett = 2,25%
	und	0,8621	» Casein = 3,28%
	26,2635 gr. Milch gaben	0,1602	» Albumin = 0,60%

Vom 23. III. 1899:	28,2375 gr. Milch gaben	1,4944 gr. Casein und Fett
	daraus	0,6058 » Fett = 2,14%
	und	0,8886 » Casein = 3,14%
	28,2375 gr. Milch gaben	0,1723 » Albumin = 0,61%
Vom 24. III. 1899:	34,4460 » » »	1,7384 » Casein und Fett
	daraus	0,7393 » Fett = 2,14%
	und	0,9986 » Casein = 2,89%
	34,4460 gr. Milch gaben	0,2120 » Albumin = 0,61%
Vom 25. III. 1899:	35,8010 » » »	1,7930 » Casein und Fett
	daraus	0,8586 » Fett = 2,39%
	und	0,9344 » Casein = 2,61%
	35,8010 gr. Milch gaben	0,2344 » Albumin = 0,65%
Vom 26. III. 1899:	36,3690 » » »	1,8047 » Casein und Fett
	daraus	0,8831 » Fett = 2,42%
	und	0,9212 » Casein = 2,53%
	36,3690 gr. Milch gaben	0,2211 » Albumin = 0,60%
Vom 27. III. 1899:	34,2360 » » »	2,0725 » Casein und Fett
	daraus	1,1826 » Fett = 3,45%
	und	0,8898 » Casein = 2,59%
	34,2360 gr. Milch gaben	0,1985 » Albumin = 0,57%

Aschenanalysen.

I. Analyse der vom 3. III.—7. III. gesammelten Milch.
100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K ₂ O	0,1330 gr.
Na ₂ O	0,0644 »
Cl	0,1035 »
Fe ₂ O ₃	0,0035 »
CaO	0,1999 »
MgO	0,0159 »
P ₂ O ₅	0,2909 »
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8111 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0232 »
	<hr/> 0,7879 gr.

Analytische Belege.

51,0223 gr. Milch gaben	0,1698 gr. KCl + NaCl
hieraus	0,3522 » K ₂ PtCl ₆
daraus berechnet . . .	0,1076 » KCl = 0,0679 gr. K ₂ O = 0,1330%
und	0,0622 » NaCl = 0,0329 » Na ₂ O = 0,0644%
25,6866 gr. Milch gaben	0,1076 » AgCl = 0,0266 » Cl = 0,1035%
100,1223 » » »	0,0072 » Fe ₂ O ₃ , P ₂ O ₅
daraus berechnet . . .	0,0033 » P ₂ O ₅
	<hr/> 0,0039 gr. Fe ₂ O ₃

durch Titration gefunden	0,0033 gr. Fe_2O_3
im Mittel	0,0036 $\rightarrow \text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0035\%$
100,1223 gr. Milch gaben	0,2002 $\rightarrow \text{CaO}_2 = 0,1999\%$
100,1223 „ „ „	0,0446 $\rightarrow \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0160$ gr. $\text{MgO} = 0,0159\%$
und	0,0284 $\rightarrow \text{P}_2\text{O}_5$
100,1223 „ „ „	0,4060 $\rightarrow \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,2596$ gr. P_2O_5
Gesammtphosphorsäure .	0,2913 $\rightarrow = 0,2909\%$

II. Analyse der vom 8. III.—14. III. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K_2O	0,1347 gr.
Na_2O	0,0653 „
Cl	0,1003 „
Fe_2O_3	0,0036 „
CaO	0,1994 „
MgO	0,0152 „
P_2O_5	0,2849 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8034 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0226 „
	<hr/> 0,7808 gr.

Analytische Belege.

75,6128 gr. Milch gaben	0,2547 gr. $\text{KCl} + \text{NaCl}$
hieraus	0,5283 $\rightarrow \text{K}_2\text{PtCl}_6$
daraus berechnet . . .	0,1614 $\rightarrow \text{KCl} = 0,1019$ gr. $\text{K}_2\text{O} = 0,1347\%$
und	0,0933 $\rightarrow \text{NaCl} = 0,0494$ „ $\text{Na}_2\text{O} = 0,0653\%$
50,1233 gr. Milch gaben	0,2036 „ $\text{AgCl} = 0,0503$ „ $\text{Cl} = 0,1003\%$
100,5532 „ „ „	0,0074 $\rightarrow \text{Fe}_2\text{O}_3, \text{P}_2\text{O}_5$
daraus berechnet . . .	0,0034 $\rightarrow \text{P}_2\text{O}_5$
	<hr/> 0,0040 gr. Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0034 $\rightarrow \text{Fe}_2\text{O}_3$
im Mittel	0,0037 $\rightarrow \text{Fe}_2\text{O}_3 = 0,0036\%$
100,5532 gr. Milch gaben	0,2006 „ $\text{CaO} = 0,1994\%$
100,5532 „ „ „	0,0426 $\rightarrow \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0153$ gr. $\text{MgO} = 0,0152\%$
und	0,0272 $\rightarrow \text{P}_2\text{O}_5$
100,5532 „ „ „	0,4002 $\rightarrow \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,2559$ gr. P_2O_5
Gesammtphosphorsäure =	0,2865 $\rightarrow = 0,2849\%$

II. Analyse der vom 15. III.—20. III. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K ₂ O	0,1294 gr.
Na ₂ O	0,0603 »
Cl	0,1000 »
Fe ₂ O ₃	0,0039 »
CaO	0,1955 »
MgO	0,0152 »
P ₂ O ₅	0,2814 »
Summe der Aschenbestandtheile .	0,7857 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0225 »
	<hr/> 0,7632 gr.

Analytische Belege.

105,2232 gr. Milch gaben	0,3355 gr. KCl = NaCl
hieraus	0,7062 » K ₂ PtCl ₆
daraus berechnet . . .	0,2157 » KCl = 0,1362 gr. K ₂ O = 0,1294%
und	0,1198 » NaCl = 0,0635 » Na ₂ O = 0,0603%
50,3666 gr. Milch gaben	0,2039 » AgCl = 0,0504 » Cl = 0,1000%
204,6432 » » »	0,0156 » Fe ₂ O ₃ , P ₂ O ₅
daraus berechnet . . .	0,0073 » P ₂ O ₅
	<hr/> 0,0083 gr. Fe ₂ O ₃
durch Titration gefunden	0,0077 » Fe ₂ O ₃
im Mittel	0,0080 » Fe ₂ O ₃ = 0,0039%
204,6432 gr. Milch gaben	0,4002 » CaO = 0,1955%
204,6432 » » »	0,0868 » Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,0312 gr. MgO = 0,0152%
und	0,0555 » P ₂ O ₅
204,6432 » » »	0,8022 » Mg ₂ P ₂ O ₇ = 0,5131 gr. P ₂ O ₅
Gesammtphosphorsäure = 0,5759 »	= 0,2814%

IV. Analyse der vom 21. III. — 25. III. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K ₂ O	0,1237 gr.
Na ₂ O	0,0570 »
Cl	0,1039 »
Fe ₂ O ₃	0,0036 »
CaO	0,1948 »
MgO	0,0153 »
P ₂ O ₅	0,2790 »
Summe der Aschenbestandtheile .	0,7773 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0234 »
	<hr/> 0,7539 gr.

Analytische Belege.

110,5228 gr. Milch gaben	0,3354 gr. KCl + NaCl
hieraus	0,7089 > K_2PtCl_6
daraus berechnet . . .	0,2166 > KCl = 0,1368 gr. K_2O = 0,1237%
und	0,1188 > NaCl = 0,0630 > Na_2O = 0,0570%
55,2367 gr. Milch gaben	0,2322 > AgCl = 0,0574 > Cl = 0,1039%
210,5622 „ „ „	0,0143 > Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet . . .	0,0069 > P_2O_5
	0,0079 gr. Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0076 > Fe_2O_3
im Mittel	0,0077 > Fe_2O_3 = 0,0036%
210,5622 gr. Milch gaben	0,4102 > CaO = 0,1948%
210,5622 „ „ „	0,0899 > $Mg_2P_2O_7$ = 0,0323 gr. MgO = 0,0153%
und	0,0574 > P_2O_5
210,5622 „ „ „	0,8182 > $Mg_2P_2O_7$ = 0,5233 gr. P_2O_5
Gesamtmphosphorsäure =	0,5876 > = 0,2790%.

Das Mittel aus den vom 3. III. — 25. III. ausgeführten Aschenanalysen ergibt:

100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K_2O	0,1302 gr.
Na_2O	0,0617 „
Cl	0,1019 „
Fe_2O_3	0,0036 „
CaO	0,1974 „
MgO	0,0154 „
P_2O_5	0,2840 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,7942 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0229 „
	0,7713 „

IV. Aschenanalyse der vom 26. III.—27. III. gesammelten Milch.

100 Gewichtstheile Ziegenmilch enthalten:

K_2O	0,1329 gr.
Na_2O	0,0623 „
Cl	0,1114 „
Fe_2O_3	0,0035 „
CaO	0,1987 „
MgO	0,0156 „
P_2O_5	0,2845 „
Summe der Aschenbestandtheile .	0,8089 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors .	0,0251 „
	0,7838 gr.

Analytische Belege.

100,5111 gr. Milch gaben	0,3298 gr. KCl + NaCl	
hieraus	0,6928	» K_2PtCl_6
daraus berechnet . . .	0,2116	» KCl = 0,1336 gr. K_2O = 0,1829%
und	0,1182	» NaCl = 0,0627 » Na_2O = 0,0623%
50,2366 gr. Milch gaben	0,2266	» AgCl = 0,0360 » Cl = 0,1114%
204,6321 » » »	0,0141	» Fe_2O_3 , P_2O_5
daraus berechnet . . .	0,0066	» P_2O_5
	0,0075	gr. Fe_2O_3
durch Titration gefunden	0,0072	» Fe_2O_3
im Mittel	0,0073	» Fe_2O_3 = 0,0085%
204,6321 gr. Milch gaben	0,4068	» CaO = 0,1987%
204,6321 » » »	0,0889	» $Mg_2P_2O_7$ = 0,0320 gr. MgO = 0,0156%
		und 0,0568 gr. P_2O_5
204,6321 » » »	0,8112	» $Mg_2P_2O_7$ = 0,5188 gr. P_2O_5
Gesamtmphosphorsäure =	0,5822	» 0,2845%

V. Meerschweinchen.

Die Meerschweinchen nehmen unter den Nagethieren eine Sonderstellung ein, indem sie in einem sehr vorgeschrittenen Entwicklungsstadium geboren werden. Das eben geborene Meerschweinchen besitzt ein vollentwickeltes Fell, offene Augen und springt sogleich munter umher. Die meisten übrigen Nagethiere dagegen werden sehr unentwickelt geboren. Die Tragzeit ist auch eine sehr verschiedene. Während die Meerschweinchen ihre Jungen ca. 10 Wochen im Uterus beherbergen, besitzen die Kaninchen und Ratten z. B. eine nur ca. 3—4 Wochen dauernde Tragzeit. Die Muttermilch spielt bei den Meerschweinchen eine untergeordnete Rolle, indem dieselben sehr bald nach der Geburt ihre Normalnahrung — grünes Futter — aufnehmen. Werden die jungen Meerschweinchen sogleich nach ihrer Geburt von ihrer Mutter getrennt und ausschliesslich mit grünem Futter ernährt, so gehen sie gewöhnlich rasch zu Grunde. Dagegen kann man die Trennung am 4.—6. Tage nach der Geburt ohne Nachtheil für die Jungen vornehmen. Bietet man den neugeborenen Meerschweinchen ausschliesslich Muttermilch als Nahrung, so nimmt ihr Körpergewicht ab; erst bei Zusatz von grünem Futter steigert sich dasselbe wieder. Dass die Muttermilch nur eine sehr untergeordnete Rolle bei den Meerschweinchen spielt, geht auch aus den unten an-

geführten Zahlen, die Körpergewichtszunahme betreffend, hervor. Es zeigte sich nämlich, dass die jungen Meerschweinchen ihr Körpergewicht in der gleichen Zeit verdoppelten, wenn sie nach 4—6 tägiger Fütterung mit Muttermilch und grünem Futter ganz auf Pflanzennahrung gesetzt wurden, und wenn sie neben der Pflanzennahrung noch Muttermilch bekamen.

Dass die Meerschweinchen im Uterus eine Periode durchlaufen, welche die übrigen Nagethiere ausserhalb desselben zubringen, geht auch aus den von Bunge gemachten Beobachtungen, den Eisengehalt der neugeborenen Meerschweinchen und den der Kaninchen betreffend, hervor.¹⁾ Aus diesen Erfahrungen geht hervor, dass das Meerschweinchen sofort nach der Geburt auf eisenreiche Nahrung angewiesen ist.

Im Folgenden gebe ich die Resultate der erhaltenen Gewichtsbestimmungen wieder.

Gewichtsbestimmungen.

I.

Die zu dem gewogenen Wurf gehörigen Meerschweinchen wurden am 10. II. 1899 geboren. Die Zahl der Jungen betrug 2. Zur Zeit der Geburt war die Mutter ca. 1 Jahr alt. Vom 10. II. bis 16. II. erhielten die Jungen Muttermilch und Krauskohl, vom 17. II. bis 28. II. bestand die Nahrung in Krauskohl. Die Wägungen gaben folgende Resultate:

Der Wurf wog:

am 10. II. 1899 155,0 gr.	am 20. II. 1899 278,5 gr.
» 11. II. 1899 150,0 »	» 21. II. 1899 290,0 »
» 12. II. 1899 151,0 »	» 22. II. 1899 305,0 »
» 13. II. 1899 160,0 »	» 23. II. 1899 320,0 »
» 14. II. 1899 168,5 »	» 24. II. 1899 325,0 »
» 15. II. 1899 175,2 »	» 25. II. 1899 340,0 »
» 16. II. 1899 200,0 »	» 26. II. 1899 355,0 »
» 17. II. 1899 230,2 »	» 27. II. 1899 365,2 »
» 18. II. 1899 254,0 »	» 28. II. 1899 370,0 »
» 19. II. 1899 262,0 »	

Die Verdopplung des Anfangsgewichtes erfolgte in 12¹/₂ Tagen.

¹⁾ G. v. Bunge, Ueber die Aufnahme des Eisens in den Organismus des Säuglings. Diese Zeitschrift, Bd. XVII, Heft 1, 1892, S. 63. Conf. auch diese Zeitschrift: Bd. XIII, S. 399, 1889 und Bd. XVI, S. 173, 1892.

II.

Die vier am 18. II. 1899 (Abends 8 Uhr) geborenen Meerschweinchen wurden von einem ca. 2 Jahre alten Thiere geworfen. Die Nahrung bestand vom 18. — 27. II. in Muttermilch und Normalnahrung (Krauskohl), vom 28. II. — 10. III. wurde Krauskohl verabreicht.

Der Wurf wog:

am 19. II. 1899 320,0 gr.	am 1. III. 1899 490,0 gr.
» 20. II. 1899 312,5 »	» 2. III. 1899 512,0 »
» 21. II. 1899 325,0 »	» 3. III. 1899 542,0 »
» 22. II. 1899 329,0 »	» 4. III. 1899 590,0 »
» 23. II. 1899 342,0 »	» 5. III. 1899 640,0 »
» 24. II. 1899 387,0 »	» 6. III. 1899 646,0 »
» 25. II. 1899 400,0 »	» 7. III. 1899 660,0 »
» 26. II. 1899 422,0 »	» 8. III. 1899 665,5 »
» 27. II. 1899 440,0 »	» 9. III. 1899 670,5 »
» 28. II. 1899 470,0 »	» 10. III. 1899 675,0 »

Die Verdopplung des Anfangsgewichtes erfolgte in 14 Tagen.

III.

Wurf vom 6. III. 1899. Der Wurf bestand aus zwei Thieren. Das Alter der Mutter betrug ca. 1 Jahr. Vom 6. III. bis 26. III. wurden die Jungen mit Muttermilch und Krauskohl ernährt. Sowohl bei diesem Wurf als bei den übrigen beobachteten machte ich die Erfahrung, dass in den ersten zwei bis drei Tagen nur sehr wenig Pflanzennahrung aufgenommen wird. Erst nach dem dritten bis vierten Tage tritt dieselbe in den Vordergrund.

Der ganze Wurf wog:

am 6. III. 1899 134,0 gr.	am 17. III. 1899 230,0 gr.
» 7. III. 1899 130,0 »	» 18. III. 1899 260,5 »
» 8. III. 1899 128,0 »	» 19. III. 1899 287,0 »
» 9. III. 1899 135,0 »	» 20. III. 1899 340,0 »
» 10. III. 1899 138,0 »	» 21. III. 1899 370,0 »
» 11. III. 1899 142,0 »	» 22. III. 1899 385,0 »
» 12. III. 1899 149,0 »	» 23. III. 1899 398,5 »
» 13. III. 1899 162,0 »	» 24. III. 1899 410,5 »
» 14. III. 1899 175,0 »	» 25. III. 1899 425,0 »
» 15. III. 1899 180,0 »	» 26. III. 1899 440,0 »
» 16. III. 1899 196,0 »	

Der Wurf verdoppelte sein Anfangsgewicht in 15 Tagen.

IV.

Der am 28. III. 1899 geborene Wurf umfasste 2 Thiere. Das Alter der Mutter betrug ca. 1 Jahr. Vom 28. III. — 8. IV. bestand die Nahrung aus Krauskohl und Muttermilch, vom 9. IV. bis 15. IV. aus Krauskohl allein.

Der ganze Wurf wog:

am 28. III. 1899 207,0 gr.	am 7. IV. 1898 340,2 gr.
„ 29. III. 1899 202,0 „	„ 8. IV. 1899 375,4 „
„ 30. III. 1899 208,0 „	„ 9. IV. 1899 392,0 „
„ 31. III. 1899 210,0 „	„ 10. IV. 1899 415,5 „
„ 1. IV. 1899 222,0 „	„ 11. IV. 1899 430,2 „
„ 2. IV. 1899 230,0 „	„ 12. IV. 1899 435,5 „
„ 3. IV. 1899 248,0 „	„ 13. IV. 1899 450,0 „
„ 4. IV. 1899 256,0 „	„ 14. IV. 1899 475,0 „
„ 5. IV. 1899 275,0 „	„ 15. IV. 1899 480,0 „
„ 6. IV. 1899 312,5 „	

Die Gewichtsverdopplung erfolgte in 13 Tagen.

Milchanalysen.

Milchanalysen wurden im Ganzen drei ausgeführt, und zwar zwei Serien von täglichen Bestimmungen des Eiweisses, des Fettes und Zuckers, und eine Aschenanalyse. Auch hier wurden vom Tage der Geburt an bis über die Zeit, welche bis zur eingetretenen Verdoppelung des Anfangsgewichtes der Jungen vergeht, hinaus täglich Eiweiss, Fett und Zucker bestimmt. Analyse II wurde an der Milch desselben Thieres ausgeführt, dessen Junge auch gewogen wurden. Zu Analyse I fehlen die zugehörigen Gewichtsbestimmungen der Jungen. Zur Aschenanalyse wurde Milch von 4 Meerschweinchen, welche an ein und demselben Tage je zwei Junge geworfen hatten, gesammelt, und zwar vom Tage der Geburt an bis zum 15. Tag nach derselben. Die Gewinnung der Milch war eine sehr leichte. Bis zum 6.—8. Tage nach der Geburt ist die Milchsecretion eine ziemlich reichliche, dann nimmt sie aber rasch ab, um oft schon am 12.—14. Tage ganz zu versiegen.

Analyse I.

Die zu dieser Analyse verwendete Milch wurde von einem ca. 1 Jahr alten Meerschweinchen, das am 27. XI. 1898 zwei Junge geworfen hatte, gewonnen. Die Resultate der durch die

täglich ausgeführten Bestimmungen erhaltenen Zahlen gibt die beistehende Tabelle. Leider konnte die Zahl der Tage, welche der Wurf brauchte, um sein Anfangsgewicht zu verdoppeln, nicht bestimmt werden. Ich nahm deshalb das Mittel aus den vier angeführten Bestimmungen als Verdoppelungszeit des Anfangsgewichtes dieses Wurfs an. Das Mittel ergibt 14 Tage.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Meerschweinchenmilch enthalten :				
	Casein	Albumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker
27. XI. 1898	5,21	0,66	5,87	8,85	1,80
28. XI. 1898	4,93	0,50	5,43	6,31	2,00
29. XI. 1898	4,88	0,59	5,47	6,34	2,25
30. XI. 1898	4,83	0,58	5,41	6,33	2,55
1. XII. 1898	4,86	0,60	5,46	6,31	2,60
2. XII. 1898	4,84	0,58	5,42	6,29	2,45
3. XII. 1898	4,86	0,59	5,45	6,25	2,22
4. XII. 1898	5,53	0,44	5,97	7,00	2,46
5. XII. 1898	4,43	0,49	4,92	7,74	2,32
6. XII. 1898	4,11	0,45	4,56	7,65	2,30
7. XII. 1898	4,04	0,40	4,44	8,27	2,25
8. XII. 1898	4,08	0,37	4,45	8,12	2,40
9. XII. 1898	4,00	0,38	4,38	8,04	2,40
10. XII. 1898	3,92	0,38	4,30	7,84	2,35
11. XII. 1898	4,48	0,38	4,86	8,44	2,30
12. XII. 1898	4,17	0,33	4,50	7,75	2,15
13. XII. 1898	4,06	0,32	4,38	7,49	2,00
14. XII. 1898	3,87	0,33	4,20	7,44	2,54

Das Mittel aus den vom 27. XI.—11. XII. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,60 ‰	} 5,09 ‰ Eiweiss.
Albumin	0,49 ‰	
Fett	7,31 ‰	
Zucker	2,31 ‰	

Das Mittel aus den vom 12. XII.—14. XII. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,03 %	} 4,86 % Eiweiss.
Albumin	0,33 %	
Fett	7,56 %	
Zucker	2,23 %	

Zahlenbelege.

Vom 27. XI. 1898:	1,3025 gr. Milch gaben	0,1840 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,1155	» Fett = 8,85 %
	und	0,0679	» Casein = 5,21 %
	1,3025 gr. Milch gaben	0,0087	» Albumin = 0,66 %
Vom 28. XI. 1898:	4,9282 » » »	0,5532	» Casein und Fett
	hierauf	0,3111	» Fett = 6,31 %
	und	0,2430	» Casein = 4,93 %
	4,9282 gr. Milch gaben	0,0251	» Albumin = 0,50 %
Vom 29. XI. 1898:	4,9050 » » »	0,5508	» Casein und Fett
	hierauf	0,3110	» Fett = 6,34 %
	und	0,2396	» Casein = 4,88 %
	4,9050 gr. Milch gaben	0,0290	» Albumin = 0,59 %
Vom 30. XI. 1898:	4,8886 » » »	0,5466	» Casein und Fett
	hierauf	0,3098	» Fett = 6,33 %
	und	0,2366	» Casein = 4,83 %
	4,8886 gr. Milch gaben	0,0286	» Albumin = 0,58 %
Vom 1. XII. 1898:	4,9512 » » »	0,5534	» Casein und Fett
	hierauf	0,3125	» Fett = 6,31 %
	und	0,2408	» Casein = 4,86 %
	4,9512 gr. Milch gaben	0,0298	» Albumin = 0,60 %
Vom 2. XII. 1898:	4,9254 » » »	0,5486	» Casein und Fett
	hierauf	0,3100	» Fett = 6,29 %
	und	0,2386	» Casein = 4,84 %
	4,9254 gr. Milch gaben	0,0291	» Albumin = 0,58 %
Vom 3. XII. 1898:	4,9555 » » »	0,5516	» Casein und Fett
	hierauf	0,3102	» Fett = 6,25 %
	und	0,2412	» Casein = 4,86 %
	4,9555 gr. Milch gaben	0,0294	» Albumin = 0,59 %
Vom 4. XII. 1898:	8,7001 » » »	1,0966	» Casein und Fett
	hierauf	0,6098	» Fett = 7,00 %
	und	0,4816	» Casein = 5,53 %
	8,7001 gr. Milch gaben	0,0389	» Albumin = 0,44 %
Vom 5. XII. 1898:	4,9644 » » »	0,6050	» Casein und Fett
	hierauf	0,3647	» Fett = 7,74 %
	und	0,2202	» Casein = 4,43 %
	4,9644 gr. Milch gaben	0,0246	» Albumin = 0,49 %

Vom 6. XII. 1898:	4,8666 gr. Milch gaben	0,5732 gr. Casein und Fett	
	hierauf	0,3725	» Fett = 7,65 %
	und	0,2005	» Casein = 4,11 %
	4,8666 gr. Milch gaben	0,0222	» Albumin = 0,45 %
Vom 7. XII. 1898:	4,9822	» » 0,6140	» Casein und Fett
	hierauf	0,4122	» Fett = 8,27 %
	und	0,2015	» Casein = 4,04 %
	4,9822 gr. Milch gaben	0,0202	» Albumin = 0,40 %
Vom 8. XII. 1898:	4,9226	» » 0,6018	» Casein und Fett
	hierauf	0,4000	» Fett = 8,12 %
	und	0,2012	» Casein = 4,08 %
	4,9226 gr. Milch gaben	0,0186	» Albumin = 0,37 %
Vom 9. XII. 1898:	5,0012	» » 0,6028	» Casein und Fett
	hierauf	0,4025	» Fett = 8,04 %
	und	0,2002	» Casein = 4,00 %
	5,0012 gr. Milch gaben	0,0192	» Albumin = 0,38 %
Vom 10. XII. 1898:	2,5522	» » 0,3004	» Casein und Fett
	hierauf	0,2002	» Fett = 7,84 %
	und	0,1001	» Casein = 3,92 %
	2,5522 gr. Milch gaben	0,0098	» Albumin = 0,38 %
Vom 11. XII. 1898:	2,5012	» » 0,3234	» Casein und Fett
	hierauf	0,2112	» Fett = 8,44 %
	und	0,1122	» Casein = 4,48 %
	2,5012 gr. Milch gaben	0,0097	» Albumin = 0,38 %
Vom 12. XII. 1898:	2,6013	» » 0,3105	» Casein und Fett
	hierauf	0,2018	» Fett = 7,75 %
	und	0,1086	» Casein = 4,17 %
	2,6013 gr. Milch gaben	0,0086	» Albumin = 0,33 %
Vom 13. XII. 1898:	2,5112	» » 0,2905	» Casein und Fett
	hierauf	0,1882	» Fett = 7,49 %
	und	0,1022	» Casein = 4,06 %
	2,5112 gr. Milch gaben	0,0076	» Albumin = 0,32 %
Vom 14. XII. 1898:	2,5811	» » 0,2926	» Casein und Fett
	hierauf	0,1922	» Fett = 7,44 %
	und	0,1000	» Casein = 3,87 %
	2,5811 gr. Milch gaben	0,0086	» Albumin = 0,33 %

Analyse II.

Die zu dieser Analyse verwendete Milch stammte von einem ca. 1 Jahr alten Meerschweinchen, das am 10. II. zwei Junge geworfen hatte. Die Bestimmung der Zeit, welche bis zum Eintritt der Verdopplung des Anfangsgewichtes verging, ergab $12\frac{1}{2}$ Tage.

Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht über die erhaltenen Resultate.

Datum der Melkung	100 Gewichtstheile Meerschweinchenmilch enthalten:				
	Casein	Albumin	Summe Casein und Albumin	Fett	Zucker
10. II. 1899	4,41	0,70	5,11	8,41	1,50
11. II. 1899	5,10	0,67	5,77	8,65	1,55
12. II. 1899	5,14	0,66	5,80	8,40	1,60
13. II. 1899	4,97	0,72	5,69	8,51	2,10
14. II. 1899	4,59	0,58	5,17	7,87	1,96
15. II. 1899	4,89	0,64	5,53	6,51	1,94
16. II. 1899	4,49	0,64	5,13	4,96	2,00
17. II. 1899	4,33	0,51	4,84	5,40	2,00
18. II. 1899	4,88	0,57	5,45	6,33	2,40
19. II. 1899	4,75	0,54	5,29	6,39	2,40
20. II. 1899	4,62	0,55	5,17	6,56	2,34
21. II. 1899	4,82	0,58	5,40	6,62	2,15
22. II. 1899	4,84	0,59	5,43	6,38	2,15
23. II. 1899	5,21	0,68	5,89	6,47	2,20
24. II. 1899	5,07	0,59	5,66	6,27	2,15
25. II. 1899	4,69	0,57	5,26	7,61	2,50
26. II. 1899	4,09	0,44	4,53	6,55	3,00
27. II. 1899	4,15	0,49	4,64	7,22	2,96
28. II. 1899	3,96	0,50	4,46	5,75	2,45

Das Mittel aus den vom 10. II. — 23. II. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,79 ‰	} Summe 5,40 ‰
Albumin	0,61 ‰	
Fett	6,96 ‰	
Zucker	2,02 ‰	

Das Mittel aus den vom 24. II. — 28. II. ausgeführten Bestimmungen ergibt:

Casein	4,89 ‰	} Summe 4,91 ‰
Albumin	0,52 ‰	
Fett	6,68 ‰	
Zucker	2,61 ‰	

Analytische Belege.

Vom 10. II. 1899:	2,5122 gr. Milch gaben	0,3228	gr. Casein und Fett
	hierauf	0,2115	» Fett = 8,41 %
	und	0,1109	» Casein = 4,41
	2,5122 gr. Milch gaben	0,0178	» Albumin = 0,70
Vom 11. II. 1899:	1,3112 » » »	0,1805	» Casein und Fett
	hierauf	0,1135	» Fett = 8,65 %
	und	0,0670	» Casein = 5,10
	1,3112 gr. Milch gaben	0,0089	» Albumin = 0,67
Vom 12. II. 1899:	1,3225 » » »	0,1795	» Casein und Fett
	hierauf	0,1112	» Fett = 8,40 %
	und	0,0681	» Casein = 5,14
	1,3225 gr. Milch gaben	0,0088	» Albumin = 0,66
Vom 13. II. 1899:	2,6112 » » »	0,3525	» Casein und Fett
	hierauf	0,2223	» Fett = 8,51 %
	und	0,1300	» Casein = 4,97
	2,6112 gr. Milch gaben	0,0190	» Albumin = 0,72
Vom 14. II. 1899:	1,4002 » » »	0,1748	» Casein und Fett
	hierauf	0,1102	» Fett = 7,87 %
	und	0,0644	» Casein = 4,59
	1,4002 gr. Milch gaben	0,0082	» Albumin = 0,58
Vom 15. II. 1899:	1,3286 » » »	0,1517	» Casein und Fett
	hierauf	0,0866	» Fett = 6,51 %
	und	0,0650	» Casein = 4,89
	1,3286 gr. Milch gaben	0,0086	» Albumin = 0,64
Vom 16. II. 1899:	4,0028 » » »	0,3788	» Casein und Fett
	hierauf	0,1986	» Fett = 4,96 %
	und	0,1800	» Casein = 4,49
	4,0028 gr. Milch gaben	0,0260	» Albumin = 0,64
Vom 17. II. 1899:	4,1211 » » »	0,4015	» Casein und Fett
	hierauf	0,2228	» Fett = 5,40 %
	und	0,1786	» Casein = 4,33
	4,1211 gr. Milch gaben	0,0214	» Albumin = 0,51
Vom 18. II. 1899:	4,9050 » » »	0,5502	» Casein und Fett
	hierauf	0,3106	» Fett = 6,33 %
	und	0,2395	» Casein = 4,88
	4,9050 gr. Milch gaben	0,0282	» Albumin = 0,57
Vom 19. II. 1899:	2,5211 gr. Milch gaben	0,2814	» Casein und Fett
	hierauf	0,1612	» Fett = 6,39 %
	und	0,1200	» Casein = 4,75
	2,5211 gr. Milch gaben	0,0138	» Albumin = 0,54

Vom 20. II. 1899:	2,5001 gr. Milch gaben	0,2799 gr.	Casein und Fett
	hierauf	0,1642	» Fett = 6,56 %
	und	0,1156	» Casein = 4,62
	2,5001 gr. Milch gaben	0,0140	» Albumin = 0,55
Vom 21. II. 1899:	5,0012 » » »	0,5726	» Casein und Fett
	hierauf	0,3312	» Fett = 6,62 %
	und	0,2412	» Casein = 4,82
	5,0012 gr. Milch gaben	0,0294	» Albumin = 0,58
Vom 22. II. 1899:	1,3500 » » »	0,1516	» Casein und Fett
	hierauf	0,0862	» Fett = 6,38 %
	und	0,0654	» Casein = 4,84
	1,3500 gr. Milch gaben	0,0080	» Albumin = 0,59
Vom 23. II. 1899:	1,2511 » » »	0,1462	» Casein und Fett
	hierauf	0,0810	» Fett = 6,47 %
	und	0,0652	» Casein = 5,21
	1,2511 gr. Milch gaben	0,0086	» Albumin = 0,68
Vom 24. II. 1899:	1,3122 » » »	0,1490	» Casein und Fett
	hierauf	0,0824	» Fett = 6,27 %
	und	0,0666	» Casein = 5,07
	1,3122 gr. Milch gaben	0,0078	» Albumin = 0,59
Vom 25. II. 1899:	1,3002 » » »	0,1609	» Casein und Fett
	hierauf	0,0990	» Fett = 7,61 %
	und	0,0611	» Casein = 4,69
	1,3002 gr. Milch gaben	0,0075	» Albumin = 0,57
Vom 26. II. 1899:	2,7116 » » »	0,2890	» Casein und Fett
	hierauf	0,1778	» Fett = 6,55 %
	und	0,1111	» Casein = 4,09
	2,7116 gr. Milch gaben	0,0120	» Albumin = 0,44
Vom 27. II. 1899:	2,6112 » » »	0,2976	» Casein und Fett
	hierauf	0,1886	» Fett = 7,22 %
	und	0,1086	» Casein = 4,15
	2,6112 gr. Milch gaben	0,0130	» Albumin = 0,49
Vom 28. II. 1899:	2,5112 » » »	0,2442	» Casein und Fett
	hierauf	0,1446	» Fett = 5,75 %
	und	0,0996	» Casein = 3,96
	2,5112 gr. Milch gaben	0,0126	» Albumin = 0,50

Aschenanalyse.

Die Aschenanalyse, deren Belege in der Arbeit über die Beziehungen der Asche des Säuglings zu denjenigen der Asche der Milch beim Meerschweinchen¹⁾ niedergelegt sind, ergab folgendes Resultat:

¹⁾ Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift. Bd. 27, Heft 4, S. 356 1899.

100 Gewichtstheile Milch enthalten:

K ₂ O	0,0754 gr.
Na ₂ O	0,0700 »
Cl	0,0999 »
Fe ₂ O ₃	0,0013 »
CaO	0,2417 »
MgO	0,0241 »
P ₂ O ₅	0,2880 »
Summe der Aschenbestandtheile	0,8004 gr.
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,0225 »
	<hr/> 0,7779 gr.

Auf der folgenden Tabelle (Seite 457—458) überblickt man die Resultate der angeführten Milchanalysen.

Die Tabelle zeigt, dass die gefundenen Werthe — aus den einzelnen Analysen vom Tage der Geburt des Wurfes an bis zur Verdoppelung des Anfangsgewichtes desselben berechnet — für die Eiweissstoffe, das Calcium und die Phosphorsäure beim Hund I und II, beim Schwein I, beim Schaf und bei der Ziege mit den zugehörigen Werthen, die Wachstumsgeschwindigkeit des Wurfes betreffend, wachsen. Die weiter unten folgende Tabelle illustriert das Gesagte. Schwein II und III weichen vom genannten Gesetze in sehr erheblichem Maasse ab. Während die Zusammensetzung der Milch der Schweine II und III nicht wesentlich von der des Schweines I abwich, war die Wachstumsgeschwindigkeit der Jungen der Würfe der beiden ersteren Schweine viel grösser als die derjenigen des Schweines I. Diese Erscheinung findet ihre Erklärung in der Natur des beobachteten Materials. Beim Schwein stehen mir im Ganzen 5 Bestimmungen der Wachstumsgeschwindigkeit neugeborener Thiere zu Gebote. Drei dieser Bestimmungen wurden an Schweinen ausgeführt, welche in der Umgebung von Basel gehalten wurden und alle von derselben Rasse — nämlich französischer — waren. Die Jungen dieser Thiere verdoppelten ihr Gewicht in 14, 13 und 14 Tagen. Zwei Bestimmungen wurden an den Jungen von Schweinen ausgeführt, welche einer nicht genauer festzustellenden Bastardrasse angehörten. Die Jungen dieser Thiere verdoppelten ihr

Zusammenstellung der Resultate der Analysen ausgeführt:

I. Vor und bis zur eingetretenen Verdopplung des Anfangsgewichtes des Wurfes desselben Thieres, dessen Milch analysirt wurde.

Species	Zeit der Verdopplung des Körpergewichtes des neugeborenen Thieres in Tagen	100 Gewichtstheile Milch enthalten:												
		Casein	Al- bumin	Summe der Eiweiss- körper	Fett	Zucker	K ₂ O	Na ₂ O	Cl	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	P ₂ O ₅	Summe der Aschen- bestand- theile
Hund I	9	4,80	2,64	7,44	11,62	3,24	0,1382	0,0779	0,1656	0,0020	0,4545	0,0195	0,5078	1,3282
Hund II	9	4,84	2,43	7,27	12,19	3,23								
Schwein I	14	3,76	1,45	5,21	9,54	3,30	0,0945	0,0776	0,0756	0,0040	0,2489	0,0157	0,3078	0,8071
Schwein II	6 1/2	3,26	1,55	4,81	7,09	3,44	0,0987	0,0794	0,0797	0,0043	0,2567	0,0163	0,3149	0,8321
Schwein III	6 1/2	3,71	1,65	5,36	6,32	3,19	0,1055	0,0828	0,0835	0,0044	0,2675	0,0172	0,3290	0,8711
Schaf	15	4,08	0,90	4,88	9,29	5,04	0,0967	0,0864	0,1297	0,0041	0,2453	0,0148	0,2928	0,8406
Ziege	22	2,91	0,76	3,67	4,33	3,61	0,1302	0,0617	0,1019	0,0036	0,1974	0,0154	0,2840	0,7713
Meerschweinchen I	14	4,60	0,49	5,09	7,31	2,31								
Meerschweinchen II	12 1/2	4,79	0,61	5,40	6,96	2,02								
Meerschweinchen III	14						0,0754	0,0700	0,0999	0,0013	0,2417	0,0241	0,2880	0,7779

Zusammenstellung der Resultate der Analysen ausgeführt :

II. Nach eingetretener Verdopplung des Anfangsgewichtes des Wurfs desselben Thieres, dessen Milch analysirt wurde.

Species	100 Gewichtstheile Milch enthalten:												
	Casein	Al- bumin	Summe der Eiweiss- stoffe	Fett	Zucker	K ₂ O	Na ₂ O	Cl	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	P ₂ O ₅	Summe der Aschen- bestand- theile
Hund I	4,42	2,34	6,76	11,31	3,42								
Schwein I	3,07	1,29	4,36	11,95	3,84	0,0942	0,0756	0,0824	0,0039	0,2402	0,0148	0,2944	0,7970
Schwein II	3,20	1,03	4,23	8,46	3,60	0,0921	0,0743	0,0711	0,0042	0,2378	0,0150	0,2919	0,7704
Schwein III	3,23	1,06	4,29	7,21	3,71	0,0985	0,0739	0,0673	0,0042	0,2406	0,0144	0,3000	0,7838
Schaf	4,07	0,52	4,59	9,44	5,22	0,0956	0,0847	0,1213	0,0044	0,2350	0,0147	0,2810	0,8094
Ziege	2,56	0,58	3,14	2,93	3,92	0,1329	0,0623	0,1114	0,0035	0,1987	0,0156	0,2845	0,7838
Meerschweinchen I	4,03	0,33	4,36	7,56	2,23								
Meerschweinchen II	4,39	0,52	4,91	6,68	2,61								

Anfangsgewicht in beiden Fällen in $6\frac{1}{2}$ Tagen. Die Mütter beider Würfe waren exquisite Mastschweine. Die sehr rasche Körpergewichtszunahme der Jungen erklärt sich am ungezwungensten durch die stattgefundene Zuchtwahl, indem zu diesen Mastthieren jedes Mal Thiere gewählt wurden, welche sich durch ein rasches Wachsthum und raschen Fettansatz auszeichneten. Es ist auch den Landwirthen wohlbekannt, dass bei den Schweinen die Wachsthumsgeschwindigkeit der Jungen eine auffallend verschiedene ist. Weil in den beiden genannten Fällen sicher erwiesen ist, dass die jungen und die alten Schweine sich nicht unter normalen Verhältnissen befanden, so habe ich dieselben von der untenstehenden Tabelle ausgeschlossen.

Ebenfalls nicht in die Tabelle gehören die bei den Meerschweinchen gefundenen Werthe, die Zusammensetzung der Milch und die Wachsthumsgeschwindigkeit der neugeborenen Thiere betreffend, und zwar aus folgendem Grunde. Die Tabelle enthält eine Vergleichung der Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch derselben Species. Beim Meerschweinchen darf von diesen Beziehungen — wenigstens in direktem Sinne — nicht gesprochen werden, indem, wie oben bei den Meerschweinchen angeführt wurde, die Verdoppelung des Anfangsgewichtes in der angegebenen Zahl von Tagen bei Ernährung mit grünem Futter erfolgte und nicht bei Muttermilchnahrung. Bei ausschliesslicher Ernährung mit Muttermilch nimmt das Körpergewicht der jungen Meerschweinchen ab. Es spielt eben die Muttermilch bei den Meerschweinchen eine ganz untergeordnete Rolle. Die jungen Meerschweinchen sind gleich nach der Geburt auf eisenreiche Nahrung angewiesen. A priori war nicht zu erwarten, dass die Milch der Meerschweinchen eine Zusammensetzung aufweist, welche zu der Wachsthumsgeschwindigkeit der Jungen in denselben Beziehungen steht, wie bei den übrigen Thierspecies. Leider liefern die Meerschweinchen nur sehr wenig Milch, es konnten deshalb nicht in der Milch ein und desselben Thieres sämtliche Stoffe ermittelt werden. Die ausgeführten Analysen erschweren auch den Vergleich mit denjenigen der

übrigen Thierspecies insofern, als nicht zu allen Milchanalysen die zugehörigen Zahlen der Wachstumsgeschwindigkeit des Wurfes vorhanden sind. Nur beim Meerschweinchen II ist dies der Fall. Zu den Milchanalysen von den Meerschweinchen I u. III wurde die zugehörige Wachstumsgeschwindigkeit der Jungen aus dem Mittel der ausgeführten Bestimmungen dieser Grösse an anderen Würfen berechnet. Die Berechnung ergab 14 Tage. Fassen wir die angeführten Milchanalysen der beiden obigen Thiere zusammen, so ergibt sich:

Zeit der Verdoppelung des Körpergewichtes des neugeborenen Meerschweinchens in Tagen	100 Theile Milch enthalten:			
	Eiweiss	Asche	Kalk	Phosphorsäure
14	5,09	0,7779	0,2417	0,2880

Vergleicht man diese Werthe mit den in der unten folgenden Tabelle angeführten, so sieht man, dass das Meerschweinchen ebenfalls dem Gesetze, die Beziehungen der Wachstumsgeschwindigkeit der Jungen zur Zusammensetzung der Milch betreffend, sich fügt. Dass die Uebereinstimmung mit den entsprechenden Werthen des Schweines, dessen Junge ebenfalls 14 Tage zur Gewichtsverdoppelung brauchten, eine nicht vollkommenere ist, dürfte seinen Grund vielleicht darin haben, dass die Milch zur Aschenanalyse nicht vom gleichen Thiere stammte, dessen Junge gewogen wurden.

Der Umstand, dass das Meerschweinchen sich dem genannten Gesetz fügt und dass, wie ich früher¹⁾ gezeigt habe, die Aschenzusammensetzung des Säuglings und der Milch übereinstimmt, ist auffallend. Sollten diese Thatsachen nicht aus der Descendenzlehre zu erklären sein? Dass dennoch auch beim Meerschweinchen das genannte Gesetz zu Recht besteht, scheint mir darauf hinzudeuten, dass es in der phylogenetischen Ent-

1) Diese Zeitschrift, Dieser Band 27. Heft 4. S. 356. 1899.

wicklung der Meerschweinchen Generationen gab, bei denen die Muttermilch dieselbe Rolle spielte wie bei den übrigen Nagethieren.

Beachtenswerth sind noch die folgenden Eigenthümlichkeiten des Meerschweinchens. Während die meisten übrigen Nagethiere sich durch eine grosse Anzahl von Jungen auszeichnen, ist die Zahl der Jungen bei den Meerschweinchen eine beschränkte. Sie beträgt bei der ersten Geburt gewöhnlich zwei. Dieser Zahl entspricht auch diejenige der Zitzen. Die Meerschweinchen besitzen nur 2 in der Inguinalgegend sitzende «Brustdrüsen». Bei den weiteren Geburten steigert sich die Zahl der Jungen gewöhnlich auf vier, aber es können auch 5—6 Junge geboren werden, meist finden sich dann todte darunter. Auch hierin machen die Meerschweinchen eine Ausnahme von den übrigen Säugethieren, indem bei diesen, soweit meine Erfahrungen reichen, im Allgemeinen nicht mehr Junge geworfen werden, als Zitzen vorhanden sind. Ist nicht diese Steigerung der Zahl der Jungen als Atavismus zu deuten?

Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht über die Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch bei verschiedenen Säugethieren. Die fettgedruckten Zahlen bedeuten, dass dieselben nach den zu Anfang dieser Arbeit angeführten Principien gewonnen wurden. Leider konnten beim Menschen, beim Pferd, beim Rind und bei der Katze die angeführten Zahlen nicht auf gleiche Weise einer Revision unterworfen werden, wie bei den übrigen Thierspecies. Ich hoffe jedoch auch für die genannten Species die genaueren Werthe noch ermitteln zu können. Die Zahlen für den Menschen, das Pferd und das Rind sind dem Lehrbuch des Herrn Prof. G. v. Bunge¹⁾ entnommen, die Zahlen für die Katze²⁾ sind von mir selbst bestimmt worden.

1) G. v. Bunge, Lehrbuch der phys. und pathol. Chemie, Aufl. 4, 1898, S. 118.

2) E. Abderhalden, Die Beziehungen der Wachsthumsgeschwindigkeit des Säuglings zur Zusammensetzung der Milch beim Kaninchen, bei der Katze und beim Hunde. Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, Heft V, 1899, S. 491.

Species	Zeit der Verdopplung des Körpergewichts vom neugeborenen Thiere in Tagen	100 Gewichtstheile Milch enthalten:			
		Eiweiss	Asche	Kalk	Phosphorsäure
Mensch	180		0,2	0,0328	0,0473
Pferd	60		0,4	0,124	0,131
Rind	47		0,7	0,160	0,197
Ziege	22		0,7713	0,1974	0,2840
Schaf	15		0,8406	0,2453	0,2928
Schwein	14		0,8071	0,2489	0,3078
Katze	9 ¹ / ₂		1,02	—	—
Hund	9	7,44	1,3282	0,4545	0,5078
Kaninchen	6	10,38	2,4998	0,8914	0,9967

Studien über Histon.

Von

Ivar Bang, Christiania.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Upsala.)

(Der Redaction zugegangen am 25. Mai 1899.)

Vergleicht man die verschiedenen Körper, die man mit dem Namen Histon bezeichnet hat, mit einander, so wird man sie so verschieden finden, dass es scheint, als ob man hierunter Körper ungleicher Art beschrieben hat.

Eine kurze Uebersicht über die Entwicklung des Histonbegriffes wird dies zeigen.

Der Histonbegriff verdankt Kossel¹⁾ seinen Ursprung, indem dieser Forscher 1884 zum ersten Male durch Salzsäure-extraction aus dem Stroma der rothen Gänseblutkörperchen einen albumosenähnlichen Körper darstellte, welchen er mit dem Namen Histon bezeichnete. Aus der salzsauren Lösung wurde das Histon durch Steinsalz niedergeschlagen; der Niederschlag löste sich wieder beim Entfernen des Salzes durch Dialyse, und die Lösung enthielt das Histon. Die neutrale Histonlösung zeigte folgende Eigenschaften: Sie wurde von den Neutralsalzen gefällt. Alkalien und alkalische Erden erzeugten ebenfalls eine Fällung, die im geringsten Ueberschuss des Fällungsmittels sich wieder löste. Ammoniak erzeugte auch Fällung und diese Fällung war im Ueberschuss von Ammoniak unlöslich, eine Eigenschaft, die als charakteristische Reaction auf Histon angesehen worden ist. Die neutrale Histonlösung coagulierte nicht beim Kochen. Mit Salpetersäure bekam man

1) Diese Zeitschrift, Bd. VIII.

einen Niederschlag, der beim Erhitzen verschwand und beim Erkalten wieder hervortrat. Die Biuretreaction war sehr schön, die Millon'sche Reaction ganz schwach. Das Histon enthielt eine Stickstoffmenge, die zwischen 17,95 % und 18,46 % nach der Darstellung (Fällung mit Alkohol-Aether oder mit Ammoniak) variirte. Weiter enthielt das Histon 0,5 % S.

Mehrere Jahre nach Kossel's Entdeckung des Gänsebluthistons wurde ein neues Histon aus der Thymusdrüse von Lilienfeld¹⁾ dargestellt. Das Histon kam hier in Verbindung mit Nuclein als Nucleohiston vor. Dieses Histon wurde von Lilienfeld als identisch mit dem Gänsebluthiston angesehen, da es dieselben Eigenschaften wie Kossel's Histon hatte: doch mit einer Ausnahme: Lilienfeld's Histon coagulirte beim Kochen oder, correcter ausgedrückt, wurde beim Kochen der neutralen Lösung ausgefällt, Kossel's aber, wie oben angeführt, nicht. Lilienfeld's Histon stammte von den weissen Blutkörperchen im Thymus her. In Uebereinstimmung hiermit konnte er auch dasselbe Histon aus den Leucocyten des Blutes und aus anderen an Leucocyten reichen Organen, wie der Milz, isoliren. Auch in den Testes will er ein Histon gefunden haben.

In dem von Mathews²⁾ aus einem Seeigel (*Arbacia*) isolirten «Histon» begegnen wir einem von dem gewöhnlichen sehr abweichenden Körper. Erstens wurde dieses Histon, von Mathews auch Arbacin genannt, nicht oder richtiger nur äusserst unvollständig von Ammoniak niedergeschlagen. Weiter enthielt das Arbacin nur 15,91 % Stickstoff im Gegensatz zu ca. 18,0 bei Kossel's Histon. Endlich besass das Arbacin zwei charakteristische Eigenschaften der Protamine: es wurde von den Alkaloidreagentien in neutraler oder schwach alkalischer Lösung gefällt und gab selbst mit einer Eiweisslösung einen Niederschlag. Da nun Mathews gar nicht angibt, inwieweit die echten Histone diese zwei Protaminreactionen geben, und da auch sonst keiner eine solche Beobachtung über das Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIII.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV.

hältniss der echten Histone zu diesen zwei Reactionen veröffentlicht hat, so ist es ganz merkwürdig, wenn man bei Mathews liest, dass das Arbacin «sich von anderen Histonen nur dadurch unterscheidet, dass es nicht durch Ammoniak niedergeschlagen werden kann».

In mehreren Beziehungen ist auch das von Schulz¹⁾ durch Spaltung des Hämoglobins dargestellte Globin, welches auch als ein Histon angesehen worden ist, von den echten Histonen verschieden. Dieser Körper wurde zwar auch aus neutraler oder schwachsaurer Lösung von Ammoniak, Alkalien und alkalischen Erden niedergeschlagen, der Niederschlag war aber im Ueberschuss des Fällungsmittels — auch Ammoniak — leicht löslich. Dagegen war der Niederschlag von Ammoniak im Ueberschuss von NH_3 unlöslich, wenn die Lösung 1—2 % Salmiak enthielt. War das Globin in Ammoniak gelöst, so konnte man auch durch Zusatz von Salmiak den Niederschlag wieder erzeugen. In seinen übrigen Reactionen war das Globin den gewöhnlichen Histonen ganz ähnlich. Der Stickstoffgehalt des Globins war 16,81 % N, also ca. 1,20 % weniger als Kossel's Histon.

Während man ohne Weiteres dem Arbacin und Globin einen Platz zwischen den Histonen gegeben hat, beansprucht die Albuminose Miescher's²⁾ aus unreifer Salmisperma nach meiner Ansicht viel mehr eine solche Stellung. Dieser Körper wurde von Ammoniak niedergeschlagen, der Niederschlag war im Ueberschusse von Ammoniak unlöslich. Sein Stickstoffgehalt war ungefähr derselbe wie beim Gänsebluthiston — ca. 0,5 % N weniger. Als Miescher aber fand, dass die Albuminose von HgCl_2 , das Gänsebluthiston nicht fällt, niedergeschlagen wurde, sah er sie nicht als ein Histon, vielmehr als eine eigenthümliche Albumose an.

Durch diese kurze Uebersicht, in der ich im Wesentlichen alles, was wir vom chemischen Standpunkte über diese Substanzen wissen, mitgetheilt habe, meine ich auch bewiesen zu

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV.

2) Archiv f. experiment. Pathologie u. Pharmacologie. Bd. 37.

haben, dass die als Histone beschriebenen Körper so verschieden sind, dass es in der That schwer ist zu sagen, was überhaupt die Histone charakterisirt. Aus diesem Grunde scheint mir eine genauere Untersuchung der «Histone» sehr wünschenswerth.

Eine solche Untersuchung habe ich, der Anregung Prof. Hammarsten's folgend, ausgeführt. Ich bin auch Prof. Hammarsten für seine immer liebenswürdige Unterstützung während dieser Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

In Verbindung mit diesen Untersuchungen hatte ich vor Allem auch eine andere Frage zum Gegenstand näherer Prüfung zu machen gehofft. Bekanntlich sieht Kossel¹⁾ die Histone als eine Verbindung von Protamin und Eiweiss an, indem er nämlich durch Mischung von Protamin- und Eiweisslösungen und Zusatz von Ammoniak einen Niederschlag bekam, der sich in jeder Beziehung wie Histon verhielt.

Ich hatte mir auch deswegen eine grössere Menge Macrelensperma verschafft. Bei der Verarbeitung des Sperma zeigte es sich aber, dass es kein Protamin enthielt, es war also unreif. Dafür fand ich in reichlicher Menge eine Substanz, welche Miescher's Albuminose aus Salmispermia ganz ähnlich war. Diese Substanz, welche ich kurz Scombron benenne, habe ich dann in Verbindung mit den Histonen untersucht. Im Ganzen habe ich die zwei Histone, Gänsebluthiston und Thymushiston, das Globin und endlich das Scombron untersucht. Da mir kein Protamin zur Verfügung stand, konnte ich die letzte Aufgabe, die Protamineiweissverbindung, nicht in Angriff nehmen, allerdings eine Lücke meiner Arbeit.

Meine Arbeitsmethode war die folgende:

Auf gewöhnliche Weise stellte ich mir Nucleohiston und Gänseblutkörperchenstroma dar, extrahirte diese mit 0,8 % iger HCl 24 Stunden, filtrirte die Lösungen und schlug die Histone durch Natronlauge nieder. Der Bodensatz wurde in ziemlich viel Wasser mit einer Spur HCl gelöst und die filtrirte Lösung wieder mit Natronlauge gefällt. Diese Procedur wurde mehrmals — ein bis drei Mal — wiederholt. Endlich bekam ich die

¹⁾ Deutsche med. Wochenschrift. 1894.

Histone nach Alkohol-Aetherbehandlung als weisses, staubendes Pulver, das sich nicht vollständig in verdünnter Salzsäure löste. Weiter wurden auch die Histone nach Kossel's Methode (Fällung der salzsauren Lösung mit Steinsalz, Dialyse und Fällung mit Aether-Alkohol) dargestellt.

Die Macrelensperma wurde zuerst mehrmals mit Alkohol ausgekocht, getrocknet und nun mit Salzsäure extrahirt. Das Extract wurde mit NaOH gefällt und dann wie oben angeführt weiter behandelt. Das Scombron war nach der Behandlung mit Alkohol und Aether gänzlich in verdünnter Salzsäure löslich. Scombronähnliche Körper lassen sich auch aus dem unreifen Sperma von Hering und Quappe darstellen.

Das Globin habe ich aus krystallisirtem Hämoglobin vom Pferde nach Schulz dargestellt.

Ich gehe nun zu meinen eigenen Untersuchungen über und fange mit der wichtigsten Reaction auf Histon, der Ammoniakreaction, an.

Die Ammoniakreaction.

Zuerst habe ich die Richtigkeit der Angaben Kossel's und Lilienfeld's über das Verhältniss des Gänsebluthistons und Thymushistons zu Ammoniak constatiren können. Auch Globin und Scombron gibt mit Ammoniak einen Niederschlag. Vier Umstände sind jedoch hier von der grössten Wichtigkeit zu bemerken:

1. das Verhältniss zu Ammoniak, wenn die Lösungen kein Ammoniaksalz oder keine Säure (wodurch ein Ammoniaksalz gebildet werden könnte) enthalten;
2. wenn die Lösungen ein Ammoniaksalz oder eine Säure enthalten;
3. ist die Relation zwischen Ammoniak und Ammoniaksalz wichtig und
4. ist es von Bedeutung, wie man das Ammoniak zusetzt (ob schnell oder langsam).

Was das erste Moment betrifft, so geben alle vier oben angeführten Körper (Gänseblut- und Thymushiston, Globin und Scombron) in neutraler Lösung, frei von Ammoniaksalzen, mit

Ammoniak einen Niederschlag. Dieser Niederschlag tritt jedoch beim Globin nur dann ein, wenn man sehr wenig Ammoniak zur Lösung setzt; schon ein Zusatz von 0,1% NH_3 gibt keine Fällung mehr. Setzt man dagegen eine solche NH_3 -Menge zu einer neutralen Lösung von Gänseblut- oder Thymushiston, so bekommt man eine reichliche Fällung. Enthalten aber diese Lösungen nicht zu viel Histon (von 0,5—1,0%), so braucht man auch in diesen Fällen nur etwa 0,5—1,0% Ammoniak zuzusetzen, um eine Fällung zu verhindern. Eine histonreichere Lösung braucht mehr NH_3 hierzu. Die Histone lösen sich also im Ueberschuss von Ammoniak, wenn die Lösungen kein Ammoniaksalz enthalten. Es ist von Bedeutung, dass man alles NH_3 auf einmal zusetzt, sonst ist der sich Anfangs bildende Niederschlag in NH_3 schwerer löslich, besonders wenn Kochsalz dabei ist. Haben die Histone eine längere Zeit in salzsaurer Lösung gestanden, so werden sie nach der Neutralisation besonders leicht im Ammoniak löslich, obwohl sie sonst gänzlich unverändert geblieben sind. Beim Scombron bekommt man auch mit Ammoniak einen Niederschlag, aber zum Unterschied von den Histonen und Globin tritt dieser Niederschlag ein, einerlei wieviel Ammoniak man auch zur Scombronlösung zusetzt. Es ist also unmöglich, eine ammoniakalische Lösung von Scombron zu bekommen.

Wir haben also gefunden, dass die Histone und das Globin sich in Ammoniak lösen können, wenn die Lösungen keine Ammoniaksalze enthalten, und werden jetzt untersuchen, wie sich die Sache bei Gegenwart von Ammoniaksalzen verhält.

Geht man von einer ammoniakalischen Lösung des Gänseblut- oder Thymushistons aus und setzt hierzu einige Tropfen einer Ammoniaksalzlösung, so kommt der Niederschlag wieder zum Vorschein. Welches Ammoniaksalz man hierzu benutzt, ist ganz gleichgültig; von Salmiak und Ammonsulfat braucht man nur bis 0,2% Salz der Lösung zuzusetzen, von essigsauerm Ammoniak mindestens 0,5%.

Die Histone sind also im Ueberschuss von NH_3 ,

gänzlich unlöslich, wenn die Lösungen ein Ammoniak-salz enthalten, oder wenn die Bildung eines solchen durch den NH_3 -Zusatz stattfindet.

Vergleichen wir hiermit, was Schulz über Globin und dessen Verhältniss zum Ammoniak berichtet. Schulz fand, dass eine ammoniakalische Lösung von Globin durch Zusatz von Salmiak wieder niedergeschlagen wurde, resp. dass eine salzsaure Globinlösung durch Zusatz von NH_3 zwar gefällt, nicht aber durch weiteren Zusatz wieder gelöst wurde. In der That habe ich auch dasselbe gefunden: das Globin kann aus einer ammoniakalischen Lösung durch Salmiak, wie auch aus salzsaurer Lösung durch Ueberschuss von NH_3 niedergeschlagen werden. Hier ist also die Relation zwischen Ammoniak und Salmiak von grosser Wichtigkeit.

Geht man z. B. von einer etwas verdünnten Globinlösung in 0,1% NH_3 aus, so entsteht der Niederschlag durch Zusatz von 2—3% Salmiak wieder und ist nun im Ueberschuss von NH_3 schwer löslich. Wenn ich dagegen 0,3% NH_3 anstatt 0,1% NH_3 benutzte, so konnte der Niederschlag auch nicht durch Zusatz des gleichen Volumens 10%iger Salmiaklösung wieder hervorgerufen werden. Bei einer globinreicheren Lösung ist die Relation zwischen NH_3 und Salmiak eine andere, immer aber fordert die Salmiaklösung sehr wenig NH_3 in der Lösung, um den Niederschlag zu erzeugen.

Hierin sind also die Histone und das Globin verschieden. Denn bei den Histonen ist es ganz gleichgültig, wie viel oder wenig Ammoniak die Lösungen enthalten. Der Zusatz eines Ammoniak-salzes bringt immer den Niederschlag hervor. Auch ist es hier ganz gleich, ob die Lösungen arm oder reich an Histon sind.

Was nun das letzte Moment, das Verhältniss dieser Substanzen in salzsaurer Lösung beim Zusatz von NH_3 angeht, so sind die beiden Histone natürlich auch in diesem Falle im Ueberschuss von NH_3 gänzlich unlöslich — es wird ja hier ein Ammoniaksalz gebildet. Setzt man aber zur salzsauren Globinlösung einen Ueberschuss von Ammoniak, so wird der sich Anfangs bildende Niederschlag augenblicklich wieder gelöst, wenn man alles NH_3 auf einmal hinzufügt. Globinlösungen von

0,5%, 0,8% und 1,6% HCl wurden z. B. durch Zusatz von NH_3 bis zu 0,5% freiem NH_3 nicht niedergeschlagen.

Wenn ich dagegen das Ammoniak vorsichtig und successive zu der Globinlösung hinzufügte, so konnte ich zu einem ziemlich grossen Ueberschuss von NH_3 gelangen, ohne dass der Niederschlag sich wieder löste. Die Ursache hierfür ist, dass das Globin, aus einer Lösung, welche ein Ammoniak-salz enthält, niedergeschlagen, sehr bald im Ueberschuss von NH_3 unlöslich wird.

Vielleicht ist es nicht überflüssig, anzuführen, dass der Niederschlag durch Ammoniak in allen Fällen nur bei alkalischer Reaction der Lösungen eintritt. Neutralisirt man dagegen nun dieselbe mit NH_3 , so bekommt man selbstverständlich keine Fällung.

In ihrem Verhältniss zum Ammoniak zeigen also die Substanzen Scombron, die Histone und das Globin erhebliche Verschiedenheiten, indem sie theils in Ammoniak allein, theils in Ammoniak und Salmiak unlöslich sind, theilweise aber auch sich in Ammoniak und Salmiak lösen. Die einzige Uebereinstimmung bei allen ist, dass man durch vorsichtigen Zusatz von NH_3 einen Niederschlag bekommt, welcher bei Gegenwart von Salmiak im Ueberschuss von NH_3 unlöslich ist, wenn man das NH_3 vorsichtig zusetzt. Dies ist aber lange nicht etwas für die «Histongruppe» Charakteristisches. Ich habe nämlich gefunden, dass auch Vitellin sich ebenso verhält. Setzt man zu einer salzsauren Lösung von Vitellin vorsichtig NH_3 , so kann man einen bedeutenden Ueberschuss zusetzen, ohne dass der Niederschlag sich wieder löst. Aus vielen Organen habe ich mittelst Salzsäureextraction Eiweisskörper bekommen, die sich ebenso verhalten. Auch die gewöhnlichen Acidalbuminate (solche habe ich mir aus Hühnereiweiss und chemisch reinem Fibrin dargestellt) zeigen dasselbe. Das Acidalbuminat aus Fibrin zeigte noch eine Uebereinstimmung mit Globin darin, dass es, in wenig Ammoniak gelöst (die Lösungen enthielten also keine Ammoniaksalze!), durch einen folgenden Zusatz von Salmiak sehr reichlich aufs Neue niedergeschlagen wurde.

Wenn aber solche Uebergänge vom Scombron zu

den Acidalbuminaten gefunden wurden, so dürfte es ziemlich schwer fallen, der Ammoniakreaction eine besondere Bedeutung als Histonreaction einzuräumen.

Ehe ich die Ammoniakreaction verlasse, darf ich wohl noch anführen, dass der Niederschlag der Histone durch Ammoniak und Salmiak nach einiger Zeit auch in Säuren schwer löslich wird, während der Histonniederschlag gleich nach der Fällung sehr leicht in Säuren löslich ist. Sind dagegen die Histone durch Ammoniak allein ohne Salmiak niedergeschlagen, so bleibt auch nach längerer Zeit ihre Löslichkeit in Säuren unverändert.

Endlich habe ich mehrere Organe, wie Leber, Niere, Pancreas¹⁾ und Testes, auf Histone und histonähnliche Substanzen untersucht, habe aber keine gefunden. Diese Organe enthalten also kein Histon, das durch Extraction mit Salzsäure von 0,5% — 0,8% sich extrahiren lässt.

Wie Ammoniak schlagen auch die Alkalien und alkalischen Erden die Histone, das Scombron und Globin aus ihren neutralen Lösungen nieder. Im Gegensatz zur NH_3 -Fällung soll dieser Niederschlag im Ueberschuss von Alkalien leicht löslich sein.

Die Histone werden schon bei der geringsten alkalischen Reaction niedergeschlagen; dieser Niederschlag löst sich wieder, wenn der Alkaligehalt bis 0,1% steigt. Sind die Histone in Alkali gelöst, tritt auch der Niederschlag aufs Neue ein, wenn man mit einer Säure zurücktitrirt, zuerst, wenn nur ca. 0,01% freies Alkali in der Lösung ist.

Sind die Histone mit Alkali niedergeschlagen, so werden sie, wenn Kochsalz dabei ist, mit der Zeit schwerer und schwerer im Ueberschuss von Alkali löslich. Dagegen sind sie auch in diesem Falle in verdünnter Salzsäure ganz leicht löslich.

Das Globin verhält sich gegenüber Alkali wie die Histone. Es ist, wenn möglich, noch leichter löslich als diese.

Das Scombron wird auch von den Alkalien niedergeschlagen. Zum Unterschied von den Histonen fordert das

¹⁾ Pancreas enthält ziemlich viel Phosphate, die einen Histonniederschlag vortäuschen können.

Scombron aber mehr Alkali zur Fällung und in Uebereinstimmung hiermit viel mehr Alkali zur Lösung des Niederschlages. Zum Beispiel konnte ich zu einer neutralen Scombronlösung von ca. 0,5% Scombron Alkali bis 0,05% NaOH zusetzen, ohne irgend welche Fällung zu bekommen. Weiter konnte ich zu derselben Lösung auf einmal Alkali bis 1%—1,5% NaOH setzen, ohne dass der Niederschlag sich löste. Einmal mit grösserem Ueberschuss von NaOH gelöst, wurde das Scombron bei Zurücktitrirung der Lauge bei einem Alkaligehalt von 1%—1,5% NaOH wieder niedergeschlagen. Das Scombron ist also viel schwerer in Natronlauge löslich als die Histone. Dagegen stimmen sie darin überein, dass die Fällung unter Umständen quantitativ ist. Diese Eigenschaft in Verbindung mit der Leichtlöslichkeit der Niederschläge in Säuren habe ich zur Darstellung dieser Substanzen benutzt.

Endlich kann ich hinzufügen, dass sowohl die Histone, wie Scombron und Globin durch 25%ige Natronlauge aus ihren Lösungen niedergeschlagen werden.

Eine andere Reaction auf Histon ist die Erhitzungsprobe.

2. Das Verhältniss der Histone beim Kochen.

Eine neutrale Lösung von Gänsebluthiston soll nach Kossel beim Erhitzen der Lösung nicht coagulirt werden, während Thymushiston nach Lilienfeld beim Erhitzen seiner neutralen Lösung niedergeschlagen wird; übrigens der einzige Unterschied zwischen diesen Histonen, den man gefunden hat.

Dieser Unterschied ist aber nur ein scheinbarer. Inwieweit die Histone beim Kochen der Lösungen niedergeschlagen werden, hängt ganz einfach von dem Salzgehalt der Lösungen ab. Zum Beispiel kann man eine neutrale salzarme Lösung von Gänsebluthiston zum Kochen erhitzen, ohne dass eine Coagulation eintritt. Setzt man aber ca. 0,5% Kochsalz zur Lösung, so coagulirt diese beim Erhitzen. Ebenso verhält sich Thymushiston. Thatsächlich findet keine Coagulation der Histone statt, sondern nur eine Fällung, die mit unveränderten Eigenschaften in einer Spur von Salzsäure äusserst leicht löslich ist. Diese Lösung kann man z. B. neutralisiren und nach Zusatz

von Kochsalz wieder durch Kochen niederschlagen. Scombron und Globin verhalten sich bei der Kochprobe wie die Histone.

Die Histone u. s. w. werden bei der Kochprobe nicht quantitativ niedergeschlagen. Ein geringer Rest bleibt im Filtrate zurück, während die Hauptmenge niedergeschlagen wird.

3. Die Salpetersäurereaction

ist die dritte Histonreaction. Wie die Albumosen werden auch die Histone (und das Scombron und Globin) von Salpetersäure niedergeschlagen; dieser Niederschlag löst sich beim Erwärmen der Lösung und kommt beim Erkalten wieder. Der Niederschlag besitzt auch die unveränderten Eigenschaften der Histone u. s. w.

Das Verhältniss der Histone, des Scombrons und des Globins zu den Salzen bietet nur wenig Interessantes. Von den Neutralsalzen geben Ammoniumsulfat und Chlornatrium einen Niederschlag sowohl bei neutraler als saurer Reaction, dagegen gibt Salmiak keine Fällung.

HgCl_2 schlägt die Histone und das Globin nicht nieder, wohl aber das Scombron, wie auch Mischer es bei seiner 'Albuminose' aus Salmsperma gefunden hat.

Sowohl die Histone wie Scombron und Globin geben eine schöne Biuretreaction und eine starke Xanthoproteinreaction, die Millon'sche Reaction ist dagegen sehr schwach.

Keiner von diesen Körpern enthält eine Kohlehydratgruppe. Nach dem Kochen mit einer Säure fiel auch die Probe von Babo-Meissner negativ aus.

Von den anderen Histonreactionen, der Kochprobe und Salpetersäureprobe, haben wir also gesehen, dass die beiden Histone, das Scombron und Globin sämmtlich dieselbe geben. Man muss nun doch fragen ob die Histongruppe durch diese drei Reactionen, die Ammoniakreaction, die Kochprobe und die Salpetersäurereaction, genügend charakterisirt ist. Wenn man dies nun auch annehmen will, so wird doch nicht die Histongruppe so scharf charakterisirt, als z. B. das Meissner'sche Parapepton, wie man es durch eine kurzdauernde Digestion von Fibrin mit Magensaft bekommt, das sowohl eine Reaction mit Ammoniak wie die Acidalbuminate, als auch

die Salpetersäurereaction wie die Histone und Albumosen gibt. Das Parapepton ist also nicht viel mehr von dem Globin verschieden, als dies von den Histonen oder die Histone von dem Scombron.

Es ist deshalb ganz nothwendig, neue Reactionen zur Charakterisirung der Histongruppe zu finden. In der That ist es mir auch gelungen, zwei solcher zu entdecken. Die eine Reaction besteht in dem Verhältniss der Histone u. s. w. zu den Alkaloidreagentien,¹⁾ die andere in dem Verhältniss zum Eiweiss.

4. Das Verhältniss zu den Alkaloidreagentien.

Bekanntlich geben beinahe alle Eiweisskörper mit den sogenannten Alkaloidreagentien in saurer Lösung einen Niederschlag, während sie, wenn ihre Lösungen (und die Lösung des Fällungsmittels) neutral reagiren, nicht niedergeschlagen werden. So geben unter anderen Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure, Ferrocyankalium und A mit einer sauren oder neutralen Eiweisslösung einen Niederschlag, während phosphorwolframsaures Natron, phosphormolybdänsaures Natron, pikrinsaures Natron und Ferrocyankalium eine neutrale Eiweisslösung nicht niederschlagen.

Diese neutralen Alkaloidreagentien sind dagegen exquisite Fällungsmittel für Histone und zugleich für Scombron und Globin in neutraler Lösung (selbstverständlich auch in saurer). Die von mir benutzten Alkaloidreagentien waren phosphorwolframsaures Natron (gesättigte Lösung), phosphormolybdänsaures Natron (5%), pikrinsaures Natron ($\frac{n}{10}$), Ferrocyankalium (2%). Die Histonlösungen u. s. w. waren etwa 0,5%—1%.

In ihrem Verhältniss zu den Alkaloidreagentien bieten die zwei Histone, das Scombron und das Globin, einige individuelle Verschiedenheiten dar.

Die Histone werden aus neutraler Lösung, nicht aber aus ihren Lösungen in Alkali durch die Alkaloidreagentien niedergeschlagen. Dieser Niederschlag ist sehr leicht löslich in Alkali. Die Fällung ist beinahe quantitativ.

1) Siehe S. 464.

Das Globin wird aus neutraler, nicht aber aus alkalischer Lösung niedergeschlagen. Phosphorwolframsaures Natron fällt eine neutrale Globinlösung nur dann, wenn sehr wenig Reagens zur Lösung gesetzt wird. Setzt man viel von diesem Reagens zu der Globinlösung, so bleibt die Fällung aus. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die, dass die Lösung des phosphorwolframsauren Natrons etwas alkalisch reagiert, und die Globinfällung ist besonders leicht in Alkali löslich. Weiter wird das Globin nur unvollständig von den Alkaloidreagentien bei neutraler Reaction niedergeschlagen, so dass man im Filtrate von diesen Niederschlägen durch Zusatz einer Säure eine neue Fällung bekommen kann. Eine Untersuchung dieser letzten Fällung zeigte, dass sie auch aus Globin bestand. Es liegen also hier nicht zwei Substanzen vor.

Das Scombron wird bei neutraler und auch bei schwacher alkalischer Reaction¹⁾ der Lösung niedergeschlagen. Dieser Niederschlag ist im Ueberschuss von Alkali schwer löslich.

5. Das Verhältniss zu Eiweisslösungen

ist die andere neue Eigenschaft der «Histongruppe», die ich gefunden habe.

Setzt man zum Blutserum eine neutrale Histonlösung, so bekommt man einen reichlichen Niederschlag. Dasselbe tritt sowohl bei Gänseblut- und Thymushiston, als auch bei Scombron und Globin ein. Alle diese Substanzen besitzen also eine eiweissfällende Eigenschaft. Da nun aber Blutserum viele verschiedene Substanzen enthält, habe ich es vorgezogen, diese Eigenschaft der Histongruppe an reinen Eiweissgruppen zu studiren. Von solchen habe ich benutzt: Lösungen von Ovalbumin (0,8%), von Serumglobulin (0,5%) und von Casein (0,6% Casein mit neutraler Reaction.) Die Lösungen der Histone, des Scombrons und des Globins waren 1%ig.

Setzte ich nun zu einer solchen Eiweisslösung die Lösung des Histons u. s. w., so bekam ich einen der Histonmenge entsprechenden grösseren oder geringeren Niederschlag. Diese

¹⁾ Wenn nämlich so wenig Alkali dabei ist, dass das Scombron noch nicht niedergeschlagen worden ist.

Fällung, welche bei neutraler Reaction eintrat, war unter Umständen beinahe quantitativ und zwar so, dass ein Theil Histon ca. zwei Theile Casein und Serumglobulin, aber nur ca. einen Theil Ovalbumin niederschlug. Dieser Niederschlag war sehr leicht in Säuren löslich und kam wieder bei Neutralisation der Lösung. Der Niederschlag war auch in Alkalien (ca. 0,2% NaOH genügt) und Ammoniak löslich. Diese ammoniakalische Lösung gab nun mit Salmiak keine Fällung, wenn ein kleiner Ueberschuss von Eiweiss da war. Die Histone selbst sind aber in Ammoniak und Salmiak, wie vorher gezeigt worden ist, vollkommen unlöslich. Das Scombron und Globin verhalten sich in dieser Beziehung ganz ähnlich wie die Histone. Also das Scombron, welches selbst in Ammoniak unlöslich ist, giebt mit einer Eiweisslösung einen Niederschlag, welcher in Ammoniak ganz leicht löslich ist.

Die Histone und das Globin geben auch, in einem Minimum von Alkali, also ca. 0,1%, gelöst, mit einer neutralen Eiweisslösung einen Niederschlag. Die Histoneiweissverbindung ist also schwerer in Alkalien löslich, als die Histone selbst. (Nicht allein die nativen Eiweisskörper geben mit den Histonen einen Niederschlag. Auch die Albumosen verhalten sich ganz ähnlich.)

Durch diese zwei Reactionen — das Verhältniss zu den Alkaloidreagentien und zum Eiweiss — könnte man in Verbindung mit den übrigen alten Reactionen die Histongruppe als eine wohl charakterisirte Eiweissgruppe ansehen, deren Unterscheidungsmerkmale von den übrigen Hauptgruppen viel prägnanter sind als z. B. die Unterscheidungsmerkmale zwischen Albuminen und Globulinen. Besonders die zwei zuletzt besprochenen Reactionen dürfte man als besonders eigenthümliche und, wie wir sogleich sehen werden, bedeutungsvoll ansehen.

Sie sprechen nämlich für eine mögliche Verwandtschaft der Histongruppe mit dem Protamin. Das Protamin wird auch von den Alkaloidreagentien bei neutraler und auch schwach alkalischer Reaction niedergeschlagen und schlägt selbst Eiweiss nieder. Diese Protamineiweissverbindung ist auch als ein Histon angesehen worden. Da nun die Histone auch Eiweiss-

verbindungen eingehen, so müssten in diesem Falle die Histone als ungesättigte Protamineiweissverbindungen aufgefasst werden. Die Histone stehen dann in demselben Verhältniss zu den Histoneiweissverbindungen, wie z. B. die Nucleine, die ja Nucleinsäure-Eiweissverbindungen sind, zu ihren Nucleoproteiden.¹⁾

In der That sind aber die zwei neuen Reactionen ebensowenig etwas für die Histone Charakteristisches, wie die übrigen alten. Als ich nämlich auch andere Eiweisskörper genau untersuchte, fand ich, dass einige von diesen auch von Alkaloidreagentien bei neutraler Reaction niedergeschlagen wurden und auch selbst Eiweiss fällten.

Was die eiweissfällende Eigenschaft betrifft, so war diese schon vorher nicht unbekannt. Hammarsten²⁾ hat nämlich gefunden, dass eine dialysirte Fibrinogenlösung mit dialysirtem Blutserum einen Niederschlag gibt. Weiter hat Kutscher³⁾ nachgewiesen, dass das Witte'sche Pepton Substanzen enthält, welche Eiweiss fällen. Die Richtigkeit von Kutscher's Beobachtung habe ich constatiren können. Weiter fand ich aber, dass eine Lösung von Witte'schem Peptone, die doch alkalisch reagirt, mit einer Lösung von phosphorwolframsaurem Natron phosphormolybdänsaurem Natron oder pikrinsaurem Natron versetzt, einen nicht unbedeutenden Niederschlag gab. Wenn ich nun diesen Niederschlag mit Baryt zersetzte, das Filtrat auf gewöhnliche Weise vom Baryt befreite, zuletzt die Lösung mit Alkohol fällte und den Niederschlag in Wasser löste, dann bekam ich eine Lösung, die sowohl mit den oben genannten Alkaloidreagentien einen Niederschlag gab, als auch Eiweiss (nicht aber Ovalbumin) niederschlug. Die Lösung gab keine Ammoniakreaction: dagegen eine Salpetersäurereaction wie die Histone. Die Biuretreaction und die Millon'sche Reaction waren positiv. Ich fand weiter, dass nur diese Substanz es ist,

1) Noch eine Aehnlichkeit mit Protamin bieten die Histone und das Scombron dadurch, dass sie einen deutlich adstringirenden Geschmack haben, wie schon Miescher es für das Protamin fand.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII.

die von den Albumosen und Peptonen im Witte'schen Peptone Eiweiss fällt. Da nun aber das Witte'sche Pepton aus gewöhnlichem, also unreinem Fibrin dargestellt ist, das z. B. Reste von weissen und rothen Blutkörperchen, die der Ursprung dieser Substanzen sein könnten, enthalten kann, so habe ich es als nothwendig angesehen, die Digestionsprodukte von reinem Fibrin zu untersuchen. Dies Fibrin habe ich mir aus dreimal gereinigtem Fibrinogen und Fibrinferment von Alex. Schmidt dargestellt. Durch eine kurzdauernde peptische Verdauung dieses Fibrins bekam ich eine Lösung, aus welcher ich nach Neutralisation eine nicht so geringe Menge einer Albumose durch phosphorwolframsaures Natron niederschlagen konnte. Die Lösung dieser Albumose (oder Albumosen) gab mit einer Eiweisslösung (doch nicht Ovalbumin) einen Niederschlag und wurde natürlich von den obengenannten Alkaloidreagentien niedergeschlagen. Die Lösung gab nicht eine Ammoniakreaction, wohl aber die Salpetersäureprobe. Beim Kochen der salzhaltigen neutralen Lösung wurde die Albumose coagulirt. Das Coagulat war in Säuren schwer löslich (im Gegensatz zu dem Niederschlage der Histone beim Kochen). Die Lösung gab mit den Neutralsalzen NaCl und Am_2SO_4 einen Niederschlag. Die Biuretreaction und Millon'sche Reaction waren positiv.

Nicht allein die Verdauungsflüssigkeit vom Fibrin enthielt solche eigenthümlichen Albumosen, auch von Albumin und Casein habe ich solche bekommen. Die Substanz scheint aber hier in geringerer Menge vorzukommen.

Diese Beobachtungen, dass die gewöhnlichen Eiweisskörper durch eine peptische Digestion unter vielen anderen auch in eine Componente gespalten werden, welche auch diese zwei neuen Reactionen gibt, hat nach meiner Ansicht ein nicht geringes Interesse.

Ich darf wohl daran erinnern, dass die Protamine diesen zwei Reactionen gegenüber sich ebenso verhalten und auch nicht von Ammoniak niedergeschlagen werden. Die Digestionsprodukte sind aber echte Eiweisskörper, indem sie auch die Millon'sche Reaction und die Salpetersäureprobe geben, was die Protamine nicht thun. Ob eine nähere Verwandtschaft

hier vorliegt, können natürlich erst fortgesetzte Untersuchungen entscheiden.

Nachdem ich so die Histonreactionen im Verhältniss zu den Histonen, dem Scombron und dem Globin sowie zu einigen anderen Eiweisskörpern untersucht habe, gehe ich nun zu meinen Untersuchungen über die elementare Zusammensetzung der Histone über.

Eine solche Untersuchung liegt für das Gänsebluthiston, das Globin und theilweise für das Thymushiston vor.

Nach Kossel hat Gänsebluthiston folgende Zusammensetzung.

C 50,67%—52,31% H 6,99%—7,09% N 17,93—18,46% S 0,50%.

Lilienfeld gibt für Thymushiston folgende Zusammensetzung an:

C 52,34% H 7,31% N ? S ?.

Schulz's Analysen zeigen für das Globin:

C 54,97% H 7,20% N 16,89% S 0,42%.

Von den Histonen habe ich Gänsebluthiston und Thymushiston nur auf Stickstoff untersucht.

Für Gänsebluthiston (die Präparate waren 3—4 mal mit NaOH niedergeschlagen) habe ich als Durchschnitt mehrerer Analysen einen Stickstoffgehalt von 17,48% gefunden, auf aschefreie Substanz berechnet. Diese Zahl ist niedriger als die Kossel's. Vielleicht lässt sich der Unterschied dadurch erklären, dass Kossel und ich verschiedene Methoden zur N-Bestimmung benutzt haben (Dumas und Kjeldahl), und das Gänsebluthiston war jedenfalls nach Kjeldahl schwer verbrennlich.

Thymushiston zeigte einen Stickstoffgehalt von 18,35% als Durchschnitt mehrerer Analysen (4 mal mit NaOH niedergeschlagen), auf aschefreie Substanz umgerechnet. Die Asche des Thymushistons enthielt viel Eisen.

Das Globin habe ich nicht analysirt. Von dem Scombrone habe ich eine vollständige Elementaranalyse ausgeführt. Ich werde die Resultate etwas eingehender beschreiben.

Ich hatte schon eine Reihe N-Analysen von viermal gereinigtem Scombrone mit dem Resultate 17,80% N gemacht, als eine Aschebestimmung lehrte, dass das Scombron ca. 12%

Asche enthielt. Die corrigirte N-Bestimmung sollte dann einen Stickstoffgehalt von über 19% N zeigen. Die Asche bestand hauptsächlich aus phosphorsaurem Kalk und Magnesia. Ich habe deswegen sämtliche Scombronpräparate der Dialyse unterworfen, und nun zeigte die Aschebestimmung 0,2—0,4% Asche. Natürlich habe ich auch durch Kontrollversuche festgestellt, dass das gereinigte Scombron seine qualitativen Reactionen unverändert beibehalten hatte.

1. Die Stickstoffanalysen.

- Präparat I. Abgewogen 0,0934 gr. Substanz n_{10} H_2SO_4
 verbraucht = 13,25 ccm. = 18,55 mgr. N = **19,86%**.
- Präparat II. Abgewogen 0,0801 gr. Substanz n_{10} H_2SO_4
 verbraucht = 11,20 ccm. = 15,68 mgr. N = **19,60%**.
- Präparat III. Abgewogen 0,1338 gr. Substanz n_{10} H_2SO_4
 verbraucht = 18,95 ccm. = 26,53 mgr. N = **19,83%**.
- Präparat IV. Abgewogen 0,1102 gr. Substanz n_{10} H_2SO_4
 verbraucht = 15,60 ccm. = 21,84 mgr. N = **19,87%**.

2. C- und H-Analysen.

- Präparat I. Abgewogen 0,2560 gr. Substanz
 CO_2 = 0,4693 gr. = **50,04%** C.
 H_2O = 0,1607 „ = **7,00%** Cl.
- Präparat II. Abgewogen 0,1908 gr. Substanz
 CO_2 = 0,3464 gr. = **49,54%** C
 H_2O = 0,1200 „ = **7,44%** H.
- Präparat III. Abgewogen 0,2718 gr. Substanz
 CO_2 = 0,4985 gr. = **50,00%** C
 H_2O = 0,1770 „ = **7,25%** Cl.

3. S-Analyse.

Abgewogen 0,7820 gr. Substanz
 $BaSO_4$ = 0,0452 gr.
 S = 0,0062 „ = **0,79%**.

Stellen wir die Zahlen zusammen, so bekommen wir folgende Tabelle:

	C	H	N	S
Präparat I.	50,04	7,00	19,86	0,79
„ II.	49,54	7,44	19,60	—
„ III.	50,00	7,25	19,83	—
„ IV.	—	—	19,87	—
Durchschnitt	49,86	7,23	19,79	0,79.

Das Scombron enthält keinen Phosphor.

Vergleichen wir nun die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Körper Gänseblut- und Thymushiston, Globin und Scombron, so werden wir einen nicht unerheblichen Unterschied bemerken. Der Uebersicht wegen stelle ich sie zu einer Tabelle zusammen.

	Gänsebluthiston	Thymushiston	Globin	Scombron
C	50,67—52,31	52,34	54,97	49,86
H	6,99— 7,09	7,31	7,20	7,23
N	17,48 [17,93—18,46]	18,35	16,89	19,79
S	0,50	—	0,42	0,79.

Während also alle Körper ungefähr denselben Wasserstoffgehalt besitzen, sind sie in Beziehung auf C und N von einander sehr verschieden, indem Scombron nur 49,86% C, Globin dagegen 54,97% C, also 5% mehr, enthält. Umgekehrt hat Scombron 19,79% N, das Globin dagegen nur 16,89% N = 3% N weniger. Die Histone können wir als Glieder einer Reihe zwischen diese beiden Substanzen stellen. Alle Substanzen enthalten Schwefel in lockerer Bindung.

Der N-Gehalt des Scombrons von 19,79% N bezeichnet das Scombron als den stickstoffreichsten Eiweisskörper, den man bis zum heutigen Tage untersucht hat.

Neben der elementaren Zusammensetzung hat es natürlich auch ein Interesse, die Spaltungsprodukte dieser Körper beim Kochen mit einer Säure und bei der Digestion mit Pepsinsalzsäure zu untersuchen.

Spaltungsversuche der Histone durch Kochen mit einer Säure habe ich nicht gemacht, da ich aus einer Notiz Fr. Müller's in der Deutschen med. Wochenschrift 1899 erfahren habe, dass solche noch nicht publicirten Untersuchungen von Kossel vorliegen. Das Histon soll ca. 40% Stickstoff in Form von Hexonbasen enthalten. Für das Scombron habe ich bei einem vorläufigen Versuche gefunden, dass dieser Körper merkwürdiger Weise nicht mehr Stickstoff in Form der Hexonbasen enthält.¹⁾

1) Bei meinen Spaltungsversuchen habe ich mich genau nach Wetzels Angaben (diese Zeitschrift, Bd. XXVI) gerichtet.

Hinsichtlich der Einwirkung von Magensaft auf diese Substanzen liegt nur eine Untersuchung des Globins von Schulz vor. Durch eine kurzdauernde Digestion des Globins mit Magensaft wurde nur echtes Pepton erhalten.

Ich habe Digestionsversuche mit Thymushiston und Scombron vorgenommen.

Digestionsversuch mit Thymushiston.

Durch eine Digestion mit Pepsinsalzsäure von 5 gr. Thymushiston während dreier Tage wurde das Histon vollständig gespalten. Ammoniak und Salmiak gaben nun keinen Niederschlag mehr. Die neutralisirte Flüssigkeit wurde von den neutralen Alkaloidreagentien reichlich gefällt, gab mit Eiweiss keinen Niederschlag, wurde aber selbst von einer neutralen Histonlösung niedergeschlagen.

Die Lösung enthielt eine geringe Menge einer Substanz, welche mit Kochsalz niedergeschlagen werden konnte. (Spur von nicht zerstörtem Histon?). Nachdem das Kochsalz durch Dialyse, wobei eine nicht geringe Menge einer Biuret gebenden Substanz ins Dialysat ging, entfernt war, wurde eine Probe der Lösung auf Albumosen untersucht, aber mit zweifelhaftem Resultate. Solche dürften deswegen nur in sehr geringer Menge vorkommen. Die Flüssigkeit wurde dann stark eingengt und in Alkohol gegossen. Man bekam einen in Alkohol schwerlöslichen und einen leichtlöslichen Theil.

Der in Alkohol schwerlösliche Theil wurde einige Male in Wasser gelöst und aufs Neue mit Alkohol niedergeschlagen. Die Substanz wurde nun nicht von den Alkaloidreagentien gefällt und gab mit einer Eiweisslösung keinen Niederschlag. Mit concentrirter Natronlauge (25%) bekam ich keine Fällung.

Der andere, in Alkohol leichtlösliche Theil, der auch nach dem Eindampfen zur Trockne in 96%igem Alkohol löslich war, gab mit den Alkaloidreagentien eine reichliche Fällung und schlug selbst eine Eiweisslösung nieder. Dies braucht nicht als ein Widerspruch gegen die Beobachtung, dass die ursprüngliche Lösung Eiweiss nicht fällte, angesehen zu werden. Denn es konnten zuerst Substanzen vorhanden sein, welche

die Ausfällung hinderten, oder die Menge der eiweissfällenden Substanzen war zu gering, um ihre Wirkung geltend zu machen; sie trat erst dann hervor, als die Lösung concentrirter war. Die Substanz wurde auch von 25% Natronlauge niedergeschlagen.

Dass diese Substanz Eiweiss fällt, hat sein grosses Interesse. Es zeigt nämlich, dass das Histon, welches selbst Eiweiss niederschlägt, unter Anderem auch in eine eiweissfällende Componente gespalten werden kann, welche mit Protamin eine grosse Aehnlichkeit zeigt.

A priori steht auch der Annahme nichts im Wege, dass hier wirklich ein Protamin vorkommen kann, da nach Kossel die Protamine selbst nach längerer peptischer Digestion nicht weiter verändert werden. Die Substanz verhält sich auch in der That in mehrfacher Beziehung wie ein Protamin:

Sie schlägt Eiweiss nieder wie Protamin, wird von den Alkaloidreagentien niedergeschlagen wie Protamin, coagulirt nicht beim Kochen, gibt keine Fällung mit Salpetersäure wie Protamin, gibt keine Millon'sche Reaction, aber eine schöne Biuretreaction (und Xanthoproteinreaction); sämmtlich Reactionen, die für die Protamine charakteristisch sind. Dass die Substanz von Salzen nicht niedergeschlagen wird, ist natürlich von untergeordneter Bedeutung.

So verlockend auch ein solcher Schluss, speciell mit Rücksicht auf Kossel's Histontheorie, ist, so wage ich doch noch nicht einen solchen zu ziehen. Erst die Elementaranalyse, zu welcher ich mir jetzt Analysenmaterial sammle, wird die Sache entscheiden.

Ein Digestionsversuch mit Scombron

zeigte, dass hier ganz andere Verhältnisse vorlagen, als beim Thymushiston.

Wurden nämlich 5 gr. Scombron mit Pepsinsalzsäure¹⁾ digerirt, so konnte ich nach mehreren Tagen keine Veränderung

¹⁾ Die Pepsinlösung war dieselbe wie bei dem Digestionsversuch mit Thymushiston.

der Lösung beobachten, anscheinend war alles Scombron unverändert. Ich setzte dann die Digestion unter Erneuerung des Pepsins fort.

Nach einer Digestion von drei Wochen wurde die Lösung untersucht. Der allergrösste Theil des Scombrons war dann anscheinend unverändert d. h. er konnte auf gewöhnliche Weise durch NaOH niedergeschlagen werden. Das Filtrat dieser Fällung gab eine ganz starke Biuretreaction. Ferner bekam man mit den Alkaloidreagentien in neutraler Lösung einen starken Niederschlag. Weiter gab die Lösung mit Eiweisslösungen (auch Hühnereiweiss) einen Niederschlag. Dieser Niederschlag, der also durch das alkalische Filtrat der Scombronfällung entstand, verhielt sich ganz eigenthümlich. Er war nämlich im Ueberschuss von Ammoniak unlöslich, während, wie man sich wohl erinnert, die Verbindung des Scombrons mit Eiweiss im Ueberschuss von Ammoniak sehr leicht löslich war. Der Niederschlag war auch in Alkalien nicht sehr leicht löslich. Dagegen war er in Säuren ganz leicht löslich, und wenn man nun diese saure Lösung neutralisirte, bekam man keine Fällung; erst wenn die Lösung alkalisch wurde, trat der Niederschlag aufs Neue ein — auch im Gegensatz zum Scombron, welches Eiweiss auch bei neutraler Reaction niederschlägt.

Das Filtrat der Scombronfällung wurde nun mit Ammoniumsulfat gesättigt, wodurch eine nicht unbedeutende Fällung entstand. Diese Fällung enthielt die Hauptmenge der Digestionsprodukte des Scombrons. Auch die neulich besprochenen Substanzen kamen hier vor.

Die Fällung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zeigte noch folgendes eigenthümliche Verhalten. Beim Kochen mit Millon's Reagens bekam man eine prachtvolle rothe Lösung, ganz wie bei Tyrosin oder Phenol, während der Bodensatz vollkommen ungefärbt war.

Nachdem die grösste Menge des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durch Concentration und Alkohol aus dem Filtrate der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung entfernt worden war, konnte nur ein sehr geringer Rest der Digestionsprodukte nachgewiesen werden. Dieser Rest gab

auch mit den Alkaloidreagentien einen Niederschlag und fällte selbst Eiweiss (doch nicht Hühnereiweiss).

Dieser Digestionsversuch, welchen ich mit grösseren Mengen Scombron zu wiederholen gedenke, um die Spaltungsprodukte genauer zu studiren, zeigt, wie verschieden sich das Scombron und das Thymushiston verhalten. Es regen auch diese Versuche zu neuen Untersuchungen an, welche ich später ausführen zu können hoffe.

Nachdem ich so die qualitativen Reactionen, die elementare Zusammensetzung und die Digestionsprodukte der Histone, des Scombrons und des Globins besprochen habe, kommen wir endlich zu der Frage, ob man diese verschiedenen Körper zu einer gemeinsamen Gruppe, der Histongruppe, zusammenfassen kann und was dann für diese Gruppe als charakteristisch angesehen werden kann.

In der Elementaranalyse haben wir zwischen den verschiedenen Gliedern der Histongruppe nicht unerhebliche Verschiedenheiten gesehen. Aber dies kann nicht der Zusammenfassung der Substanzen hindernd im Wege stehen, da z. B. die Mucine in ihrem Stickstoffgehalte nicht weniger untereinander variiren wie diese Körper.

Grösseres Bedenken gegen eine solche Zusammenfassung erweckt schon die grosse Verschiedenheit des Scombrons und Thymushistons bei Digestion mit Magensaft. Da aber die Untersuchungen hier noch nicht vollständig zu Ende geführt sind, so kann dieses Moment auch nicht ausschlaggebend sein.

Es bleiben dann noch die qualitativen Reactionen. Von diesen sind keine an und für sich für die Histongruppe charakteristisch. Die Kochprobe und die Salpetersäureprobe sind nicht charakteristisch, noch weniger Werth darf man auf die Ammoniakreaction legen. Die am meisten eigenthümlichen Reactionen, das Verhältniss zu den Alkaloidreagentien und zum Eiweiss, sind auch nicht etwas für die Histongruppe Charakteristisches. Wenn man deswegen die Histongruppe charakterisiren will, muss man diese sämmtlichen fünf Reactionen zusammen aufstellen.

Dem gegenwärtigen Standpunkte unseres Wissens entsprechend, finde ich es auch berechtigt, eine solche Eiweissgruppe aufrecht zu erhalten und überlasse es der Zukunft, zu entscheiden, ob man sämtliche Reactionen beibehalten kann oder nicht, d. h. ob man auch andere Substanzen, z. B. die Digestionsprodukte des gewöhnlichen Eiweisses u. A., mitnehmen will oder auf der anderen Seite einige Glieder der Histogruppe ausrangiren muss.

Bis auf Weiteres werden also die Histone dadurch definirt, dass sie in neutraler Lösung durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak niedergeschlagen werden (der Niederschlag wird bei Gegenwart eines Ammoniaksalzes sehr bald im Ueberschuss von Ammoniak unlöslich) und dass sie von Salpetersäure niedergeschlagen werden. Beim Erhitzen der Lösung löst sich der Niederschlag und kommt beim Erkalten wieder. Drittens werden die Histone beim Kochen der neutralen Lösung gefällt, wenn die Lösungen etwas Kochsalz enthalten, nicht aber, wenn die Lösungen salzarm sind. Viertens werden die neutralen Lösungen der Histone von den neutralen Lösungen der Alkaloidreagentien niedergeschlagen und fünftens besitzen sie eiweissfällende Eigenschaften.

Als Histone können wir Gänseblut- und Thymushiston, Scombron und Globin zusammenfassen.

Die vorliegende Untersuchung ist mit Unterstützung des Houen'schen Legates ausgeführt.

Ueber das Verhalten des Benzoyl- und des Calciumsuperoxyds im Verdauungskanal des Menschen und des Hundes.

Von

M. Nencki und J. Zaleski.

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1899.)

Seit der Erkenntniss, dass ein nicht unerheblicher Theil der Nahrungsstoffe in unserem Darmkanal nicht durch die Verdauungssäfte, sondern durch die im Darne befindlichen Mikroben zersetzt wird, und seitdem wir gezeigt haben, welche Spaltungsprodukte im Darne gerade für die Darmfäulniss, resp. die Gährung der Kohlehydrate im Gegensatz zu den Verdauungsprodukten charakteristisch sind, wurden vielfache Versuche angestellt, um diese Darmfäulniss durch passende Darmantiseptica zu beeinflussen, resp. zu beschränken.

Die ältesten rein empirischen, d. h. ohne Kenntniss der Rolle der Mikroben im Darmrohr angewandten Darmdesinficientia, sind die Abführmittel, und bis auf den heutigen Tag sind bei Störungen im Verdauungstractus Oleum ricini oder Calomel die gebräuchlichsten Heilmittel. Freilich ist eine völlige Darmdesinfection dadurch nicht erreichbar und ihre Anwendung auf die Dauer nicht zulässig. Nachdem der Eine von uns gefunden hat, dass der pankreatische Saft nicht allein die Fette, sondern auch Säureester der aromatischen Reihe in ihre Componenten zerlegt, wurde es möglich, starke Desinficientia in grösserer Menge in den Darm, ohne Schaden für den Organismus, einzuführen. Dem zuerst für diesen Zweck empfohlenen Phenol-ester der Salicylsäure, dem sogenannten Salol, folgte eine Reihe ähnlich zusammengesetzter Stoffe, und obgleich sowohl

das Salol par excellence, als auch manche in diese Gruppe gehörige Verbindung als werthvolle Arzneimittel eine ausgedehnte Anwendung in der ärztlichen Praxis finden, so ist damit der ideale Zweck, die parasitische Zersetzung des Speisebreies im Darme, je nach dem Wunsche des Arztes einzuschränken oder gänzlich aufzuheben, noch lange nicht erreicht und voraussichtlich nicht so bald zu erreichen.

Die Gründe dafür sind mannigfach. Wir führen mit Speise, Getränk und der verschluckten Luft täglich von Neuem frische Mikroben, meistens von unbekannten Eigenschaften, dem Verdauungskanal zu. Dann ist es nicht leicht, ein Antisepticum zu finden, das ohne Schaden für die Darmschleimhaut, resp. für den ganzen Organismus die im Darmlumen befindlichen Mikroben vernichten oder wenigstens ihre Lebensthätigkeit aufheben würde. Unzweifelhaft verhält sich die Darmschleimhaut selbst gegenüber diesen Parasiten und ihren Stoffwechselprodukten nicht indifferent und besitzt Mittel und Wege, um ihre schädliche Einwirkung möglichst einzuschränken. Es ist ja bekannt, dass die meisten Toxine vom unverletzten Darme aus unwirksam sind, und wir¹⁾ haben noch vor Kurzem gezeigt, dass das Diphtherie- und das Tetanotoxin durch den Magensaft, namentlich aber durch den pankreatischen Saft und Galle entgiftet werden; aber die Erforschung der Vertheidigungsmittel des Organismus gegen die Darmmikroben hat erst begonnen und ist daher noch recht lückenhaft. Auch über den Umfang und die Intensität der Gährungsvorgänge in unserm Verdauungskanal, ihre Abhängigkeit von der Nahrung und verschiedenen anderen Factoren wissen wir ebenfalls sehr wenig. Es ist daher als ein Fortschritt in technischer Hinsicht zu begrüßen, dass es Prof. Sahli in Bern gelungen ist, mittelst seiner Glutoidkapseln verschiedene Stoffe in den Darm einzuführen, ohne dass sie vorher im Magen zur Wirkung gelangen, resp. verändert werden. Da einzelne Eiweisspaltungsprodukte der aromatischen Reihe, wie die Oxysäuren, das Indol, Skatol, Phenol, Kresol im Darme nur durch die Thätigkeit der Bakterien entstehen

1) Centralblatt f. Bakteriologie Bd. 23, 1898. Nr. 19. 20.

und, insofern sie resorbirt werden, als Aetherschwefelsäuren in den Harn übergehen, so hat Baumann vorgeschlagen, die Intensität der Eiweissfäulniss im Darne aus den vermehrten Aetherschwefelsäuren im Harne zu bemessen. Dieser Maassstab kann nur ein approximativer sein, da ein unbestimmter, aber nicht unerheblicher Theil dieser aromatischen Produkte nicht als Aetherschwefelsäure, sondern mit Glykuronsäure gepaart in den Harn übergeht. Mehr geeignet dafür ist die Bestimmung des Harnindicans, da sowohl die aus dem resorbirten Indol entstandene Indoxylätherschwefelsäure, wie die Indoxylglykuronsäure nach dem Verfahren von Obermeyer durch Zusatz rauchender Salzsäure und Eisenchlorid zum Harn gespalten und in Indigo übergeführt werden. Nicht alle Spaltpilze bilden aber aus Eiweiss Indol und die Thätigkeit der meisten Mikroben im Darne entzieht sich jeder genaueren Bestimmung.

Vor ungefähr 10 Jahren wurde von Macfadyen, Nencki und Sieber¹⁾ eine Untersuchung über die chemischen Vorgänge im menschlichen Dünndarm veröffentlicht, welche später noch von Dr. Jakowski²⁾ in Warschau fortgesetzt wurde. Durch diese Arbeiten wurde festgestellt, dass die Gährungsvorgänge im menschlichen Verdauungskanal auch räumlich sich verschiedenartig gestalten. Im Magen sind sie unter normalen Verhältnissen durch die Magensaftsäure derart behindert, dass sie schwerlich irgend welche Bedeutung für den Organismus haben. Im Dünndarme, wo die Reaction des Speisebreies bis in den untersten Theil des Ileum auf Lackmus schwach sauer war, sind es hauptsächlich die Kohlehydrate, die durch die Mikroben zerlegt wurden. Nach unseren Bestimmungen³⁾ enthält der Dünndarminhalt von Hunden durchschnittlich nur 30 mgr. Ammoniak in 100 gr. Flüssigkeit. Nach den Amidosäuren der Fettreihe haben wir vergeblich den Dünndarminhalt unserer Patientin untersucht. Indol, Skatol, Schwefelwasserstoff und Methylmercaptan haben wir nur in den Contentis aus dem unteren Theil des Ileum, und

1) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. XXVIII, S. 311.

2) Archives des sciences biologiques de l'institut de médecine expérimentale à St. Petersbourg. T. I. p. 540.

3) Vgl. Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chem. XXV, 457.

auch da nicht constant, gefunden. Die Destillate des Dünndarminhaltes gaben uns mit Brom kein Tribromphenol, folglich war in dem Darminhalt weder Phenol noch p-Kresol vorhanden. Ob das Pentamethyldiamin, das von Werigo¹⁾ als Produkt der pankreatischen Eiweissverdauung und von Jakowski im Dünndarminhalt seiner Patientin gefunden wurde, ein spezifisches Produkt der Eiweissfäulniss oder der pankreatischen Verdauung ist, können wir nicht mit Bestimmtheit sagen.

Ausser Albumosen und Peptonen haben wir daher die specifischen Fäulnissprodukte des Eiweisses im Dünndarminhalt des Menschen bis zur Ileocoecalclappe manchmal gar nicht, in anderen Fällen nur in geringer Menge gefunden. Anders war es mit den Umwandlungsprodukten des Zuckers, wovon wir in erheblichen Mengen die isomeren Milchsäuren, flüchtige Fettsäuren, vorwiegend aus Essigsäure bestehend, vorfanden. Ob der auch bei absoluter Abstinenz von Alkohol in der Nahrung in geringer Menge im Dünndarminhalte von uns und Jakowski gefundene Aethylalkohol durch Spaltpilze oder Hefen, welche letzteren constant im Dünndarminhalt enthalten sind, gebildet wird, ist schwer zu entscheiden und von nebensächlicher Bedeutung. So viel ist sicher, dass im menschlichen Dünndarm die Produkte der Kohlehydratgährung bei Weitem grösser sind, als wie die der Eiweissgährung. Der Hauptsitz der Eiweissgährung ist der menschliche Dickdarm und reagirt hier auf Lackmus bei gemischter Kost nicht allein die Darmschleimhaut, sondern auch der Darminhalt alkalisch.²⁾

1) Pflüger's Archiv, 51. 362. 1892.

2) Herr Prof. Dr. M. Matthes und Dr. E. Marquardsen (Ueber die Reaction des Dünndarminhalts von M. Matthes und E. Marquardsen, Separatabdruck aus den Verhandlungen des XVI. Congresses für innere Medicin), die hauptsächlich an Hunden experimentirten, kommen zu dem Resultat, dass der Dünndarminhalt eigentlich alkalisch reagire, da er nur auf Indicatoren, die auf Kohlensäure empfindlich sind, saure Reaction zeige. Derselbe Darminhalt, der gegen Rosolsäure, Phenolphthalein und Curcuma sauer reagirt, reagirt auf Cochenille, Methylorange und rothes Lackmoid stets und zwar stark alkalisch. Wir sahen uns deshalb veranlasst, die Reaction des Dünndarminhalts bei Hunden nachzuprüfen. Das Ergebniss unserer Versuche war folgendes: Ein grosser gesunder

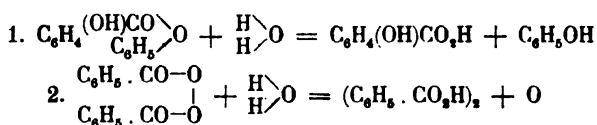
Es ist seit langem durch die Analysen der Gase des Verdauungstractus von Planer, Ruge, K. B. Hofmann und Tappeiner bekannt, dass nur die Magengase etwas Sauerstoff, von der verschluckten Luft herrührend, enthalten. Die Dünndarmgase bestehen nur aus Kohlensäure, Wasserstoff und Stick-

Hund wurde um 9 Uhr Morgens mit Hafergrütze und Fleisch bis zur Sättigung gefüttert, um 2 Uhr Mittags, also 5 Stunden später, durch Verblutung aus der Art. crur. getödtet und der Darminhalt sofort untersucht. Magen, Dünndarm und Dickdarm sind mit Speisebrei gefüllt. Mageninhalt reagirt auf Lackmus, Lackmoid und Methylorange sauer, desgleichen der Inhalt des Duodenum. Im oberen Drittheil des Dünndarms ist die Reaction auf diese Indicatoren die gleiche, jedoch schwächer. In der Mitte des Dünndarms ist die Reaction auf Lackmus, Lackmoid, Methylorange, Congo und Phenolphthalein schwach, aber deutlich alkalisch. Von da abwärts ist die Reaction stärker alkalisch. Dickdarminhalt stark alkalisch. Bei zwei anderen Hunden, die ebenfalls mit Hafergrütze und Fleisch gefüttert und 7 Stunden später durch Verblutung getödtet wurden, war der Befund identisch, und zwar wie folgt: Im Magen viel Speisebrei von saurer Reaction. Im Duodenum reagirt der Speisebrei auf Lackmus, Lackmoid, Methylorange, Congo und Phenolphthalein schwach, aber deutlich alkalisch. In der Mitte des Dünndarms und abwärts war die Reaction des Speisebreis stark alkalisch. Ebenso reagirte der Dickdarminhalt. Der Dünndarminhalt war halbflüssig, übelriechend. Der Dickdarminhalt consistent, stark stinkend. — Dieser Befund ist also verschieden von dem bei den Patientinnen mit Darmfistel von uns und Dr. Jakowski. Bei diesen Frauen reagirte der Dünndarminhalt auf Lackmus nicht etwa amphoter (weinroth), sondern deutlich roth, wie dies nur durch verdünnte Mineral- oder organische Säuren bewirkt wird. Bei den zwei letzten Hunden reagirte schon im oberen Theil des Dünndarms auf Phenolphthalein der Inhalt alkalisch. Wir halten unsere Angabe, dass bei unseren Patientinnen die saure Reaction nicht auf Rechnung der Kohlensäure, sondern der im Dünndarminhalt enthaltenen freien Fettsäuren zurückzuführen ist, vollkommen aufrecht. Die Angabe von Matthes und Marquardsen, dass die Reaction des Dünndarminhalts als eine ziemlich constante bezeichnet werden muss, ist nach unseren Befunden irrtümlich und schwankt offenbar je nach der Thierspecies, der Zeit, wann die Prüfung vorgenommen wurde u. s. w., innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Die Reaction kann schon vom Duodenum bis hinunter zum Rectum sowohl auf Phenolphthalein wie auf Methylorange alkalisch sein (Hunde) und in anderen Fällen (wie bei unseren Patientinnen) reagirt der Dünndarminhalt bis zur Ileocoecalclappe, in Folge seines Gehaltes an freien organischen Säuren, sauer.

stoff. In den Dickdarmgasen finden wir ausser diesen noch Methan, Schwefelwasserstoff und Methylmercaptan. Die Kohlensäure des Dünndarms hat einen doppelten Ursprung. Sie entsteht einerseits durch die Einwirkung der Salzsäure, der Milchsäuren, der Bernsteinsäure und der Fettsäuren des Speisebreis auf die alkalischen Verdauungssäfte; andererseits entsteht sie, gleich wie der Wasserstoff, als Gährungsprodukt der Kohlehydrate im Dünndarm.

Die Gährungen im Darne verlaufen also ganz ohne Sauerstoff, und die darin wirksamen Mikroben sind entweder facultative oder obligate Anaräobien. Für die Erforschung der Gährungsvorgänge im Darm ist es daher von besonderem Interesse, zu erfahren, wie sich dieselben gestalten werden, wenn im Darmlumen freier Sauerstoff vorhanden sein wird. Das Problem, im Darne freien Sauerstoff zu haben, war nicht ganz leicht zu realisiren. Direkte Einführung von Sauerstoff in den Darm ist aus verschiedenen Gründen nicht zulässig. Am zweckmässigsten schien es uns, in den Darm eine Substanz einzuführen, die darin als Sauerstoffentwickler functioniren würde. Folgende Ueberlegung, wobei wir wieder an den pancreatischen Saft appellirten, hat uns auch zur Lösung des Problems, wenn auch nur im Principe, geführt. Schon im Jahre 1863 hat Brodie organische Superoxyde beschrieben, die er durch Einwirkung von Säurechloriden auf Baryumsuperoxyd dargestellt hat. Vor Kurzem haben die Herren Pechmann und Vanino¹⁾ neue Beobachtungen über diese Körper veröffentlicht. Bekanntlich werden durch Alkalien oder den pancreatischen Saft Säureester in ihre Componenten zerlegt. So zerfällt beispielsweise das Salol in Salicylsäure und Phenol. Nun können die organischen Superoxyde aufgefasst werden als Säureester des Wasserstoffsuperoxyds, und thatsächlich zerfällt z. B. Benzoylsuperoxyd, mit Alkali erhitzt, in Benzoesäure und Sauerstoff. Folgende Gleichungen veranschaulichen die Analogie der beiden Processe:

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXVII, S. 1510, Bd. XXIX, S. 1724, Bd. XXX, S. 2003.



Wenn Benzoylsuperoxyd wirklich im Sinne der obigen Gleichung im Darne zerfällt, so muss das verfütterte Benzoylsuperoxyd in den Harn als Benzoesäure resp. Hippursäure übergehen, und aus der Menge der erhaltenen Hippursäure könnte man berechnen, wie viel Sauerstoff im Darm frei wurde. Die hierauf bezüglichen Versuche, sowie die späteren mit Calciumsuperoxyd haben wir gemeinschaftlich mit Herrn Dr. Karuschas ausgeführt und zunächst unsere Voraussetzung für kleinere Dosen des Benzoylsuperoxyds bestätigt gefunden.

Das Benzoylsuperoxyd ist ein weisser, krystallinischer Körper, unlöslich in Wasser, schwer löslich in heissem Alkohol. Er schmilzt bei 103—104°. Auf Platinblech trocken erhitzt verpufft er. Brodie, wie oben erwähnt, erhielt ihn zuerst durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf Baryumsuperoxyd. Pechmann-Vanino haben zu seiner Darstellung Benzoylchlorid auf wässeriges Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge einwirken lassen. Wir haben es auf folgende Weise mit guter Ausbeute erhalten. In einem Kölbchen werden 150—200 ccm. Wasser auf 0° abgekühlt und darin allmählich 20 gr. Natriumsuperoxyd gelöst und der Lösung ebenfalls in kleinen Portionen und unter fortwährendem Schütteln und Abkühlen 50 gr. Benzoylchlorid zugesetzt. Nach einer Viertelstunde wird der abgeschiedene weisse Krystallbrei abfiltrirt, gut ausgewaschen und aus heissem Alkohol umkrystallisirt. Ein so dargestelltes Präparat ergab bei der Elementaranalyse folgende Zahlen:

0,2893 gr. der über SO_4H_2 getrockneten Substanz gaben 0,1178 gr. H_2O und 0,7352 gr. $\text{CO}_2 = 4,52\%$ H und 69,31% C. Die Formel: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_4$ verlangt 4,13% H und 69,42% C.

Benzoylsuperoxyd, Hunden von 15—30 kg. Körpergewicht in Fleischpillen gereicht, wird selbst in Dosen von 5—10 gr. gut vertragen. Im ersten Versuche erhielt ein grosser, junger Hund, 30 kg. schwer, 1 gr. Benzoylsuperoxyd. Die darauf gelassene 24stündige Harnmenge wurde durch einige Tropfen

Sodalösung schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade zum starken Syrup eingedampft, hierauf nach dem Erkalten mit Alkohol extrahirt, das alkoholische Filtrat von Neuem auf dem Wasserbade verdunstet, der erkaltete Rückstand mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mehrfach mit Essigäther extrahirt. Nach Abdestilliren des Essigäthers und Zusatz von etwas Wasser schied sich die Hippursäure in braungefärbten Krystallnadeln ab, die bei der mikroskopischen Untersuchung ganz homogen und frei von Benzoesäure waren. Durch Umkrystallisiren der abfiltrirten und an der Luft getrockneten Krystalle aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle wurde die Hippursäure leicht rein erhalten. Nach Verfütterung von 1 gr. Benzoylsuperoxyd wurden 0,603 gr. Hippursäure erhalten. Nach Verfütterung von 2 gr. erhielten wir aus dem Harn 1,391 gr. Hippursäure. Nach Verfütterung von 5 gr. erhielten wir nur etwas über 2 gr. Hippursäure. Wäre alles einverleibte Benzoylsuperoxyd gespalten, so müssten nach 1 gr. Benzoylsuperoxyd 1,47 gr. Hippursäure ausgeschieden werden. Der absoluten Sicherheit wegen wurde die aus dem Harne des Versuchshundes erhaltene Hippursäure analysirt und ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0,2552 gr. der über SO_4H_2 getrockneten Substanz gaben 0,5623 gr. CO_2 und 0,1171 gr. H_2O . Ferner 0,3006 gr. gaben 21,1 ccm. N-Gas bei $18,8^\circ$ und 760,7 mm. Barometerstand. In Procenten wurden erhalten 60,10% C, 5,10% H und 8,13% N. Die Formel der Hippursäure = $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ verlangt C 60,33%, H 5,03% und N 7,82%.

Es unterliegt demnach keinem Zweifel, dass das verfütterte Benzoylsuperoxyd im Organismus gespalten und als Hippursäure ausgeschieden wird. Diese Spaltung ist aber selbst bei kleinen Dosen keine vollkommene, denn nach Verfütterung von 1 gr. Benzoylsuperoxyd erhielten wir aus dem Harne statt 1,47 gr. nur 0,603 gr. und nach 2 gr. Benzoylsuperoxyd statt 2,94 gr. nur 1,39 gr. Hippursäure, also etwas weniger als die Hälfte der erwarteten Menge. Bei grösseren Dosen von Benzoylsuperoxyd ist der Procentgehalt der erhaltenen Hippursäure noch geringer. Offenbar passirt selbst bei kleinen Dosen etwa die Hälfte des verfütterten Superoxyds den Darm unver-

ändert und je grösser die Dose, um so weniger relativ wird davon im Darne gespalten. A priori war ein solches Resultat auch zu erwarten. Das Benzoylsuperoxyd ist in lauwarmem Wasser oder verdünnten Alkalien kaum löslich und wird erst beim Kochen mit freien Alkalien allmählich in Benzoesäure und Sauerstoff zerlegt. Unsere Versuche zeigen im Gegentheil, wie energisch die Pankreasenzyme wirken, da sie selbst einen so schwer zerlegbaren Körper spalten können, denn dass diese Spaltung durch den pankreatischen Saft geschieht, davon haben wir uns durch direkte Versuche überzeugt.

Um den natürlichen Verhältnissen besser zu entsprechen und da aus früheren Versuchen uns bekannt war, dass Gemische von Pankreassaft und Galle energischer wirken als Pankreassaft allein, haben wir abgemessene Mengen dieser beiden Verdauungssäfte mit Benzoylsuperoxyd gemischt und im Thermostaten eine Zeitlang stehen gelassen. Wenn durch die Verdauungssäfte das Superoxyd zersetzt war, so musste Sauerstoff frei werden. Das entwickelte Gas wurde daher aufgefangen und nach den Methoden von Bunsen resp. Doyér analysirt. Wir wollen hier die angestellten Versuche anführen.

Zu einem Gemische von 30 ccm. frischen pankreatischen Saftes, erhalten von einem Hunde mit Pankreasfistel nach Milchfütterung (Verfahren von Pawlow) und 15 ccm. Galle, erhalten von einem Hunde mit Gallenfistel, wurde 1 gr. feingepulvertes Benzoylsuperoxyd zugesetzt, tüchtig durchgeschüttelt und 3 Stunden lang im Thermostaten bei 37° stehen gelassen. Die Anfangs gelbbraune Flüssigkeit wurde bald grün, später röthlich gefärbt. Nach 3stündigem Stehen wurden 17,4 ccm. (auf 0° und 760 mm. Barometerstand reducirt) Gas erhalten. Das Gas bestand in Volumprocenten aus 67,8% CO₂, 20,5% N und 11,7% O. Die alkalisch reagirende Verdauungsflüssigkeit wurde mit etwas HCl angesäuert, filtrirt und das Filtrat mit Aether extrahirt. Nach Verdunsten des ätherischen Auszugs hinterblieben Krystalle, welche aus heissem Wasser umkrystallisirt nach dem Trocknen bei 120° schmolzen und ausserdem durch die Krystallform und Verhalten beim trocknen Erhitzen genügend als Benzoesäure charakterisirt wurden.

Unzweifelhaft ist also hier aus dem Benzoylsuperoxyd Sauerstoff frei geworden. Als wir den Versuch *ceteris paribus* wiederholten, nur mit dem Unterschiede, dass die Flüssigkeit nicht 3, sondern 10 Stunden im Thermostaten verblieb, wurden 20 ccm. Gas erhalten, bestehend aus 18 ccm. Kohlensäure, 2 ccm. Stickstoff und kein Sauerstoff. Der freiwerdende Sauerstoff oxydirt daher unter Kohlensäurebildung die organischen Substanzen der verdauenden Flüssigkeit; denn als wir in einem dritten Kontrollversuche die gleiche Menge Pankreassaft und Galle, jedoch ohne Benzoylsuperoxyd, 3 Stunden lang bei 37° stehen liessen, veränderte die Flüssigkeit ihre Farbe nicht und wurde überhaupt gar kein Gas entwickelt.

Wir haben diese Versuche in rein theoretischer Absicht unternommen und suchten zunächst zu erfahren, erstens, ob es möglich sei, im Darmrohr aus chemischer Verbindung Sauerstoff zu entwickeln, und zweitens, welchen Einfluss dieser Sauerstoff auf die Gährungsprocesse im Darmrohr haben wird. Unsere Versuche zeigen, dass im Darmrohr aus Benzoylsuperoxyd wohl Sauerstoff frei wird, jedoch in so geringer Menge, dass er unmöglich einen Einfluss auf die Gährungen ausüben kann, zumal die Verdauungssäfte selbst den freiwerdenden Sauerstoff absorbiren. In der That entsprechen z. B. die nach Verfütterung von 2 gr. Superoxyd erhaltenen 1,391 gr. Hippursäure im Harne 0,946 gr. zersetzten Superoxyds. Da nun Benzoylsuperoxyd bei der Zersetzung nach der Gleichung: $(C_6H_5CO)_2O_2 + H_2O = (C_6H_5CO_2H)_2 + O$ nur 6,6% freien Sauerstoff gibt, so entsprechen die 0,946 gr. zersetzten Superoxyds nur 0,063 gr. freien Sauerstoffs = 44,7 ccm.

Obleich nach dem eben Gesagten die Einverleibung von Benzoylsuperoxyd voraussichtlich keinen Einfluss auf die in den Harn übergehenden Produkte der Darmfäulniss ausüben dürfte, so hat doch Herr Dr. Karuschas bei mehreren Hunden eine Reihe von Bestimmungen der Schwefelsäure der Salze und der gepaarten Schwefelsäure, des Indigo und des Phenols im Harne vor und nach Verfütterung des Benzoylsuperoxyds ausgeführt. Das Ergebniss war, dass das Verhältniss der Schwefelsäure der Salze zu den Aetherschwefelsäuren ziemlich dasselbe war,

vor wie nach der Benzoylsuperoxydfütterung. Das Gleiche war auch bezüglich der Indicanausscheidung der Fall. Phenol war bei den untersuchten Hunden weder vor noch nach der Benzoylsuperoxydfütterung in bestimmbar Mengen im Harne vorhanden.

Aehnliche Versuche wie mit dem Benzoyl haben wir auch mit dem Phtalylsuperoxyd angestellt, welchen letzteren Körper, nur mit bedeutend geringerer Ausbeute, wir nach dem gleichen Verfahren wie das Benzoylsuperoxyd aus Phtalylchlorid dargestellt haben.

Nach Versuchen, die der Eine von uns schon vor vielen Jahren angestellt hat, geht Phtalsäure, an Hunde verfüttert, unverändert in den Harn über. In drei Versuchen, wo wir Hunden Phtalylsuperoxyd in Dosen von 2—5 gr. in Fleischpillen verabreichten, haben wir nur einmal etwa 0,02 gr. Phtalsäure aus den Aetherextracten des Harnes erhalten können. Phtalylsuperoxyd wird demnach nur in minimalen Mengen im Darmrohr zerlegt. Interessant ist es aber, dass dieser äusserst explosive Körper selbst in Dosen bis zu 5 gr. ohne Schaden vertragen wurde. Wir haben keine Versuche mit Superoxyden der aliphatischen Reihe angestellt. Möglicherweise, dass sie als Sauerstoffentwickler in der Zukunft in der Medicin noch eine Bedeutung haben werden. Zunächst handelte es sich nur darum, zu constatiren, ob überhaupt im Organismus aus den Superoxyden Sauerstoff abgespalten wird. Für diesen Nachweis war das Benzoylsuperoxyd die geeignetste Verbindung. Unsere andere Absicht — den Einfluss des Sauerstoffs auf die Darmgärungen zu ermitteln — war vorläufig mittelst organischer Superoxyde nicht zu erreichen. Die Beschäftigung aber mit den organischen Superoxyden legte uns den Gedanken nahe, auch das Verhalten der Metallsuperoxyde im Organismus zu untersuchen. Von Wasserstoffsuperoxyd ist es seit Langem bekannt, dass es eine stark antiseptische Substanz ist. Von den Metallverbindungen des Wasserstoffsuperoxyds waren die meist bekannten, sei es wegen ihrer Giftigkeit, sei es wegen der physikalischen Eigenschaften, für physiologische Versuche nicht geeignet. Die für unsere Zwecke brauchbarste Verbindung war das Calcium-

superoxyd, womit wir auch physiologisch recht interessante Resultate erzielten.

Die Superoxyde der alkalischen Erden wurden von Schöne¹⁾ und Conroy²⁾ dargestellt und näher untersucht. Wir haben das Hydrat des Calciumsuperoxyds nach den Angaben von Em. Schöne durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf die Lösung des Calciumhydroxyds bereitet. Damit reines Produkt erhalten wird, ist es nothwendig, dass die in Wirkung tretenden Reagentien keine fremde Beimischung, namentlich Schwefel- oder Phosphorsäure, enthalten; auch ist es nothwendig, das Filtriren und Trocknen des Calciumsuperoxyds in einer kohlenstofffreien Atmosphäre auszuführen. Das lufttrockene krystallinische Salz ist nach der Formel: $\text{CaO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ zusammengesetzt und ist in Wasser sehr wenig löslich. Die Lösung reagirt alkalisch und schmeckt etwas brennend, adstringirend. Da Calciumsuperoxyd durch Salzsäure in Wasserstoffsuperoxyd und Chlorkalcium zerlegt wird und Wasserstoffsuperoxyd mit Jodkalium sich nach der Gleichung: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{KJ} = 2\text{KHO} + 2\text{J}$ umsetzt, so lässt sich durch Titration des ausgeschiedenen Jods mit unterschwefligsaurem Natron der Gehalt an reinem CaO_2 in einem gegebenen Präparate leicht bestimmen. Bei der Zersetzung nach der Gleichung: $\text{CaO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca(OH)}_2 + \text{O}$ gibt das wasserfreie Superoxyd 22,2% Sauerstoff und das wasserhaltige Salz $= \text{CaO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ genau die Hälfte davon, d. h. 11,1%. Je nach dem Wassergehalte schwankt daher die Menge des activen Sauerstoffs in den verschiedenen Präparaten. Immerhin ist sie bedeutend grösser als die aus dem Benzoylsuperoxyd erhältliche, welche letzte Verbindung theoretisch nur 6,6% freien Sauerstoff geben kann.

Unsere nächste Aufgabe war, die eventuelle Giftigkeit des Calciumsuperoxyds, sodann das Verhalten dieses Salzes gegen den Magensaft resp. Pankreasaft und Galle zu ermitteln. In Bezug auf die erste Frage fanden wir, dass von Hunden nicht allein kleine Dosen 2—4 gr., sondern selbst einmalige Dosen

1) Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft Bd. VI S. 1173.

2) ibid. Bd. VI, S. 769.

von 6–10 gr. in Fleischpillen verabreicht, anscheinend ohne jede Störung, gut vertragen werden; auch bezüglich der zweiten Frage waren die Resultate günstig, da das Calciumsuperoxyd sowohl durch den Magensaft, wie auch durch das Gemisch von Pankreasaft und Galle unter Freiwerden von Sauerstoff zerlegt wird, wie dies aus folgenden Versuchen hervorgeht:

1. Zu 40 ccm. Magensaft — nach der Methode von Pawlow von gastro- und oesophagotomirtem Hunde erhalten — wurden in einem mit Ableitungsröhrchen versehenen Kölbchen 0,5 gr. CaO_2 zugesetzt und das während 3ständigen Stehens im Thermostaten bei 37° entweichende Gas über Quecksilber aufgefangen und analysirt. Auf 0° Temperatur und 760 mm. Barometerstand reducirt, war die entwickelte Gasmenge = 22,14 ccm.; nach Absorption der CO_2 = 20,63 ccm. und nach Absorption des O = 6,86 ccm. Das Gas bestand demnach in Volumprocenten aus 6,8% CO_2 und 62,2% O. Der Rest war Stickstoff.

2. Auf gleiche Weise wurden 20 ccm. pankreatischen Saftes, 10 ccm. Hundegalle aus der Gallenfistel und 0,5 gr. CaO_2 für $2\frac{1}{2}$ Stunden im Thermostaten stehen gelassen; die Anfangs braungelbe Flüssigkeit wurde hellgrün. Entwickelte Gasmenge = 35,11 ccm. Nach Absorption der CO_2 = 31,35 ccm. Nach Absorption des O = 2,81 cm. Folglich enthielt das Gas in Volumprocenten 10,7% CO_2 und 81,3% O.

3. 30 ccm. pankreatischen Saftes 15 ccm. Hundegalle und 1 gr. CaO_2 wurden im Thermostaten 3 Stunden lang stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde hellroth. Entwickelte Gasmenge = 21,35 ccm. Nach Absorption der CO_2 = 20,95 ccm. Nach Absorption des O = 0,94 ccm. Das Gas enthielt also in Volumprocenten 1,87% CO_2 und 95,5% O.

4. 20 ccm. Pankreasaft und 10 ccm. Galle wurden mit 20,46 ccm. reinem aus chlorsaurem Kalium dargestellten Sauerstoff 3 Stunden lang im Thermostaten stehen gelassen. Die Flüssigkeit nahm eine dunkelrothe Farbe an. Die entwickelte Gasmenge war = 23,84 ccm. Nach Absorption der CO_2 = 18,70 ccm. Nach Absorption des O = 0,55 ccm.

In diesem Falle wurden von den Verdauungssäften ab-

sorbirt 2,31 ccm. Sauerstoff und dafür 5,14 ccm. Kohlensäure entwickelt. Dies geschieht offenbar, auch wenn der Sauerstoff aus dem Calciumsuperoxyd her stammt. Dass bei Anwendung von Magensaft aus dem CaO_2 zuerst H_2O_2 und erst aus dem letzteren freier Sauerstoff entstehen wird, das war von vorn herein zu erwarten. Bemerkenswerth ist es aber, dass auch bei Anwendung von alkalischen Säften, wie Pankreassaft und Galle, ebenfalls Sauerstoff entsteht. Wir finden darin eine Bestätigung der früheren Versuche von Guttman¹⁾ Schwerrin²⁾ und Coppola³⁾ wonach H_2O_2 innerhalb des Thierkörpers in Berührung mit dem alkalisch reagirenden Blute sich unter Freiwerden von Sauerstoff zersetzt. Dass bei Anwendung des Magensaftes Calciumsuperoxyd in verhältnissmässig kurzer Zeit bei der Bruttemperatur gelöst wird, geht aus folgenden Versuchen hervor:

1. Zu 50 ccm. frischen Magensaftes wurden 0,5 gr. CaO_2 zugesetzt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Pulver löste sich nur langsam auf unter schwacher Gasentwicklung. Nach einer Stunde wurde vom Ungelösten filtrirt und zum Filtrate 10 ccm. 20%iger Jodkaliumlösung zugesetzt. Es hat sich Jod ausgeschieden, das mit einer titrirten Lösung von $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ bestimmt wurde. Auf freien Sauerstoff berechnet enthielt das Filtrat davon 12,6 ccm.

2. Zu 50 ccm. frischen Magensaftes wurden 0,5 gr. CaO_2 zugesetzt und im Thermostaten bei 37° 3 Stunden lang stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit war das Pulver bis auf einen minimalen Rest gelöst. Die Flüssigkeit wurde filtrirt und das Filtrat mit Jodkaliumlösung versetzt. Auch hier hat sich Jod abgeschieden, das mit $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ titrirte und auf freien Sauerstoff umgerechnet 15,5 ccm. O im Filtrate entsprach.

Die Thatsache, dass selbst grössere Mengen des Calciumsuperoxyds dem Magen ohne Schaden zugeführt werden können, spricht dafür, dass CaO_2 nicht als solches resorbirt, sondern

1) Virchow's Archiv, Bd. 73, S. 23.

2) Virchow's Archiv, Bd. 73, S. 37.

3) Maly's Jahresber. für 1887, S. 103.

im Verdauungstractus zerlegt wird. Andernfalls müssten auf Grund der Versuche von Coppola, nach einigermaßen grösserer resorbirter Quantität des CaO_2 tödtliche Embolien, in Folge des in den Blutgefässen freiwerdenden Sauerstoffs, eintreten, was wir bei den zahlreichen Versuchen an Thieren und auch an Menschen nie beobachtet haben.

Unsere Versuche über den Einfluss des Calciumsuperoxyds auf die Fäulniss im Darne haben wir an 3 Hunden angestellt, die mit Fleisch und Hafergrütze gefüttert wurden. Der Stickstoffgehalt des Harns schwankte wenig und betrug durchschnittlich 2%. Ebenso war das Verhältniss des Harnstoffstickstoffs zum Gesamtstickstoff normal, indem der Harnstoffstickstoff 80—87% des Gesamtstickstoffs ausmachte. Irgend welche abnorme Bestandtheile oder Eiweiss, Zucker, Gallenfarbstoff enthielt der Harn dieser Hunde auch nach grösseren Gaben von CaO_2 nicht. Nur die Reaction des Harns wurde nach CaO_2 alkalisch, oder falls der Harn schon vorher alkalisch reagierte, wurde die Alkalescenzenz stärker.

Die Gesamtschwefelsäure und die Aetherschwefelsäure im Harne wurde nach der Vorschrift von Salkowski bestimmt. Phenol resp. p-Kresol war im Harne der Hunde, an denen wir experimentirten, vor oder nach der CaO_2 -Fütterung höchst selten, und dann nur in Spuren, während der Fütterung mit dem Superoxyd nie im Harne vorhanden. Zur Bestimmung des Indicans wurde der Harn nach F. Obermeyer mit unzureichender Menge Bleizucker gefällt, durch trockenes Filter filtrirt, 5 ccm. des Filtrates mit 5 ccm. rauchender Salzsäure, die 2% sublimirtes FeCl_3 enthielt, versetzt, 1—2 Minuten durchgeschüttelt und das Indigo mit 2 ccm. Chloroform aufgenommen und colorimetrisch bestimmt, d. h. mit Lösungen von Indigo in Chloroform von bestimmtem Gehalte und absteigender Concentration verglichen. Bekanntlich ist reines Indigoblau in Chloroform nur spurenweise löslich. Nach unseren Bestimmungen enthalten 100 ccm. bei 20° gesättigter Chloroformlösung 0,84 mgr. Indigoblau. Concentrirtere Lösungen des Harnindigo wurden daher so lange mit bestimmten Mengen von Chloroform verdünnt, bis sie einer Probe unserer Farben-

skala entsprachen. Die Normallösungen, im Dunkeln und in zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt, sind monatelang haltbar. Diese Indicanbestimmungen können vollkommene Genauigkeit nicht beanspruchen, doch waren sie für unseren Zweck genügend und sind sehr leicht auszuführen.

Die Seite 504 u. 505 folgenden Tabellen zeigen den Einfluss der CaO_2 -Fütterung auf die Ausscheidung des Indicans und der Aetherschweifelsäuren.

Die erhaltenen Zahlen zeigen, dass bei dem Hunde Nr. I im ersten Versuche weder Indican noch die Aetherschweifelsäuren nach Verabreichung von 2, 4 und selbst 8 gr. des Calciumsuperoxyds merklich herabgesetzt wurden. Erst nach 10 gr. CaO_2 sind die Aetherschweifelsäuren etwas vermindert und das Indican ganz verschwunden. Aber in der 3. Serie des Versuches mit Hund Nr. I ist selbst nach einer Dose von 12 gr. CaO_2 nur an diesem Tage eine Verminderung der Aetherschweifelsäure und des Indigo bemerkbar und schon am nächsten Tage ist die Ausscheidung der beiden Indicatoren der Darmfäulniss wie an den Tagen vor der CaO_2 -Fütterung. Die Wirkung des Superoxyds ist eine kurzdauernde. Bei den Hunden Nr. II und III, die fast täglich CaO_2 erhielten, ist die Verminderung der Aetherschweifelsäure und Schwund des Indicans deutlich erkennbar.

Hervorheben müssen wir, dass die Hunde eigentlich nur halb so grosse Dosen des Superoxyds, als in den Tabellen angegeben, erhielten, da wir stets nicht das wasserfreie, sondern das wasserhaltige Salz $= \text{CaO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$, das nur etwas verwittert war, verfütterten. Das von uns dargestellte Calciumsuperoxyd war über Schwefelsäure und Aetzkali getrocknet und später in gut schliessenden Gefässen aufbewahrt. Dabei verlor die Verbindung, entgegen der Angabe von Em. Schöbe (l. c. S. 1173), das Krystallwasser nicht vollständig. Wasserfreies Calciumsuperoxyd bei der Zersetzung nach der Gleichung: $\text{CaO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca(OH)}_2 + \text{O}$ müsste 155,2 ccm. Sauerstoff, das wasserhaltige: $\text{CaO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$ dagegen genau die Hälfte, d. h. 77,6 ccm. Sauerstoff (auf 0°C . und 760 mm. Hg-Druck bezogen), entwickeln. Während der Fütterungsversuche haben

wir wiederholt unser Präparat mit Salzsäure zersetzt und dabei das entwickelte Sauerstoffvolumen gemessen. Wir erhielten für je 1 gr. des Präparates 86,4 ccm., 88,3 ccm., 87,9 ccm., 87,5 ccm., im Mittel also 87,5 ccm. = 0,1251 gr. Sauerstoff: also etwa 10 ccm. mehr, als die Formel: $\text{CaO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$ verlangt.

Bei unseren Versuchen wurde das in Fleisch eingewickelte Pulver den Thieren in den Rachen hineingeschoben. Ein Theil des Superoxyds ist daher schon im Magen zersetzt worden und wahrscheinlich nur der kleinere Theil kam im Darne zur Wirkung. Nehmen wir an, dass im Darne 3—5 gr. des verabreichten Superoxyds zerlegt wurden, so ergibt das 250 bis 435 ccm. Sauerstoff, und es ist jedenfalls interessant, dass diese geringe Menge der Substanz die Bildung der Fäulnisprodukte entschieden herabsetzte.

Wenn wir uns die Frage stellen, was eigentlich hier die Fäulniss verminderte, das entstandene Kalkhydrat, das Wasserstoffsuperoxyd oder der daraus entwickelte Sauerstoff, so ist eine bestimmte Antwort hierauf schwer zu geben. Aus den noch zu erwähnenden Versuchen des Dr. Roszkowski geht hervor, dass das Calciumsuperoxyd ein vorzüglicher Ersatz der Kalkmilch ist, bei der dyspepsia acida und den Sommerdiarrhöen der Kinder. Die antiseptische Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds ist durch die Untersuchungen früherer Forscher wohl bekannt. Nach Hettinga Tromp¹⁾ wurden Typhusbacillen nach 5 Minuten durch 5‰-, Cholera vibrionen durch 1‰-Lösung von H_2O_2 getödtet. Selbst Milzbrandsporen sollen durch 5‰-Lösungen abgetödtet werden. Aber warum wirkt H_2O_2 antiseptisch? Vielleicht doch nur deshalb, weil es, wie schon Thénard²⁾ gefunden, in Berührung mit thierischen Flüssigkeiten oder Geweben in Wasser und atomistischen Sauerstoff zerfällt, und die oxydirende resp. mikrobezerstörende Wirkung des letzteren ist, gleich wie die des Ozons, zweifellos.

Um zu ermitteln, wie viel Calciumsuperoxyd bei Ausschluss

1) Maly's Jahresber. f. 1887. 473.

2) Maly's Jahresber. f. 1882. 108.

Datum.	Verabreichtes Calciumsuperoxyd in Grammen.	24stün- dige Harn- menge.	Speci- fisches Gewicht.	Reaction.	Gesamt- SO ₄ H ₂ in 100 A.	Aether- SO ₄ H ₂ in 100 B.	B A.	Indigo in mgr. in 100 ccm. Harn.
Hund Nr. I, 28 Kilo schwer.								
17. XII.	—	970	1,036	alkalisch	0,2904	0,0225	1:13	0,34
18. "	—	1350	1,031	"	0,2582	0,0167	1:16	0,35
19. "	—	1360	1,027	"	—	—	—	0,45
20. "	2 gr. Ca O ₂	1200	1,033	stark alkalisch	0,2938	0,0130	1:23	0,67
21. "	4 gr. Ca O ₂	1390	1,030	"	0,2432	0,0148	1:16	0,34
22. "	8 gr. Ca O ₂	1360	1,026	alkalisch	0,2298	0,0130	1:18	0,11
31. XII.	—	—	—	—	—	—	—	0,45
1. I.	—	—	—	—	—	—	—	0,34
2. "	10 gr. Ca O ₂	1240	1,031	alkalisch	0,2034	0,0084	1:24	0
3. "	—	1500	1,027	"	0,2270	0,0109	1:20	0
4. "	—	1250	1,023	"	0,1650	0,0091	1:18	0
5. "	—	1500	1,023	"	0,1641	0,0070	1:24	0
6. "	—	1760	1,022	"	0,2414	0,0193	1:25	0,78
7. "	—	1510	1,033	"	0,1891	0,0144	1:13	Spuren
22. "	—	1880	1,023	alkalisch	0,1916	0,0217	1:9	0,34
23. "	—	2100	1,024	"	0,1580	0,0204	1:8	0,22
24. "	12 gr. Ca O ₂	1700	1,023	"	0,2220	0,0097	1:23	Spuren
25. "	—	1680	1,026	neutral	0,1928	0,0165	1:11	0,22
26. "	—	1470	1,027	"	0,1767	0,0185	1:10	0,23

Hund Nr. II, 29 Kilo schwer.

		1400	1,023	schwach alkalisch	0,2064	0,0236	1:9	1,12
30. I.	—	1970	1,019	"	0,2002	0,0205	1:10	0,90
31. II.	10 gr. Ca O ₃	2010	1,025	"	0,2056	0,0224	1:9	1,01
1. "	—	2100	1,030	alkalisch	0,2134	0,0148	1:14	0
2. "	10 gr. Ca O ₃							
3. "	15 gr. Ca O ₃ in 2 Portionen, worauf der Hund erbrach.	2010	1,023	"	0,2120	0,0142	1:15	0
4. "	—	2120	1,028	"	0,2102	0,0194	1:11	0,34
5. "	2 mal je 5 gr. Ca O ₃	2100	1,018	"	0,2218	0,0140	1:15	0
6. "	Desgleichen	1960	1,020	"	0,2324	0,0146	1:16	0
7. "	3 mal je 5 gr. Ca O ₃	2060	1,019	"	0,2278	0,0143	1:16	0
8. "	Desgleichen	1920	1,019	"	0,2252	0,0134	1:17	0
9. "	2 mal je 5 gr. Ca O ₃	1980	1,020	"	0,2334	0,0157	1:15	0

Hund Nr. III, 15,5 Kilo schwer.

		700	1,014	schwach alkalisch	0,1676	0,0092	1:18	1,90
17. "	—	520	1,012	"	0,2043	0,0102	1:20	1,01
18. "	—	490	1,010	"	0,2063	0,0109	1:19	0,90
19. "	—	650	1,020	"	0,2993	0,0159	1:19	0,31
20. "	2 mal je 3 gr. Ca O ₃	740	1,016	"	0,2083	0,0066	1:32	Spuren
21. "	3 gr. Ca O ₃ vor dem Futter	930	1,015	"	0,1924	0,0071	1:27	Spuren
22. "	Desgleichen	350	1,029	"	0,3080	0,0085	1:36	0
23. "	5 gr. Ca O ₃ nach dem Futter	180	1,041	"	0,5399	0,0167	1:32	0
24. "	3 gr. Ca O ₃ nach dem Futter	630	1,036	"	0,4704	0,0152	1:31	0
25. "	8 gr. Ca O ₃ vor dem Futter	1010	1,022	neutral	0,2137	0,0062	1:34	0
26. "	5 gr. Ca O ₃ mit dem Futter	830	1,015	"	0,1904	0,0048	1:27	0
27. "	3 gr. Ca O ₃ vor dem Futter	1350	1,015	"	—	—	—	0,22
28. "	—	1080	1,020	"	—	—	—	0,67
1. III.	—	1180	1,021	"	—	—	—	0,22
2. "	—							

des Magens im Darne zerlegt wird, haben wir Pillen aus CaO_2 und Lakrizensaft, die mit ammoniakalischer Keratinlösung überzogen wurden, angefertigt. Jede Pille enthielt 0,5 gr. CaO_2 . Die Pillen erwiesen sich als unbrauchbar, da sie unverändert in Excremente der Hunde übergingen. Wir beabsichtigen, diese Versuche mit den Glutoidkapseln von Sahli¹⁾ zu wiederholen; auch sind wir mit der Darstellung von Magnesiumsuperoxyd beschäftigt. Wenn Magnesiumsuperoxyd den gleichen Effect wie das Calciumsuperoxyd haben wird, dann ist die Annahme gerechtfertigt, dass die fäulniswidrige Wirkung dieser Superoxyde im Darne in erster Linie auf den nascirenden atomistischen Sauerstoff zurückzuführen ist.

Das unschädliche Verhalten des Calciumsuperoxyds, wie wir uns überzeugt haben, auch für den menschlichen Organismus, veranlasste uns, zu prüfen, ob bei Verdauungsstörungen das Calciumsuperoxyd sowohl wegen seiner Alkalinität, wie wegen seiner antiseptischen Eigenschaften nicht von therapeutischem Nutzen sein werde. Herr Dr. J. Roszkowski, Arzt am Kinderhospital in Warschau, hat auf unseren Vorschlag hin seit Anfang des Jahres 1898 das Calciumsuperoxyd bei verschiedenen Krankheiten des Magens und des Darms angewendet und seine Beobachtungen darüber in der *Gazeta lekarska*²⁾ veröffentlicht. Danach soll das Calciumsuperoxyd, namentlich bei dyspepsia acida der Kinder, von ganz vorzüglicher Wirkung sein. Wir möchten aus diesem Anlasse dankbar erwähnen, dass uns für diese klinischen Versuche die bekannte Firma von Dr. F. v. Heyden Nachfolger in Radebeul bei Dresden das Calciumsuperoxyd, das von ihr unter dem Namen «Gorit» bezogen werden kann, in grösseren Quantitäten und chemisch reinem Zustande zur Verfügung stellte.

1) Deutsches Archiv für klin. Med. LXI, 445.

2) Jahrgang 1899.

Ueber das Vorkommen von Pentosen im Harn.

Von

E. Salkowski.

(Aus dem chem. Laboratorium des patholog. Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 30. Mai 1899.)

Beobachtungen über das Vorkommen von Pentaglycosen oder Pentosen, deren weite Verbreitung im Pflanzenreich hauptsächlich von Tollens und seinen Schülern erwiesen ist, im Thierkörper lagen meines Wissens bis zum Jahre 1892 nicht vor. In diesem Zeitpunkt gelang es mir, in einem Harn, welcher M. Jastrowitz durch seine Reductionsfähigkeit bei mangelndem Drehungsvermögen und Gährungsvermögen bezw. durch die ungenügende Uebereinstimmung dieser Eigenschaften aufgefallen war, Pentosen mit Sicherheit aufzufinden.¹⁾ Später konnte ich dann noch 2 weitere Fälle von Pentosurie feststellen, über die ich in der Berl. Klin. Wochenschr. 1895, Nr. 17, kurz berichtete, indem ich an derselben Stelle zugleich die Belege für die Pentosen-Natur des Kohlenhydrats mittheilte.²⁾

1) Centralbl. f. d. med. W. 1892, Nr. 19 und 35.

2) Fr. Müller hat diese Thatsache als unsicher hingestellt (Sitzungsber. der Marb. Ges. zur Beförderung der ges. Naturw. 1898, Nr. 6). Er sagt u. A.: «Auf den Schmelzpunkt und selbst die Elementaranalyse der Osazone wird man aber dann nur geringen Werth legen dürfen, wenn es sich wie hier um so kleine Osazonmengen handelt, dass eine gründliche Reinigung durch häufiges Umkrystallisiren nicht möglich war.»

Ich habe mich seitdem vielfach und zwar hauptsächlich in zwei Richtungen mit dem Gegenstand beschäftigt: einerseits habe ich mich bemüht, die Methode des Nachweises für klinische Zwecke zu vereinfachen, andererseits habe ich neue Fälle aufzufinden gesucht, letzteres hauptsächlich in der Hoffnung, ein mit Pentosurie behaftetes Individuum aufzufinden, welches seiner socialen Lage nach geneigt sein würde, sich einer genaueren Beobachtung in einer Klinik zu unterwerfen, von welcher wahrscheinlich eine weitere Förderung unserer Kenntnisse über die Pentosurie zu erwarten gewesen wäre. Obwohl mir nun im Laufe der Jahre von befreundeten Seiten eine sehr grosse Zahl von verdächtigen, d. h. stärker als normal reducirenden Harnen zugegangen ist, sind alle meine Bemühungen, noch einen weiteren Fall von Pentosurie aufzufinden, vergeblich gewesen, sodass es mir jetzt, nachdem fast 7 Jahre nach meiner ersten Beobachtung vergangen sind, an der Zeit scheint, meine Beobachtungen im Zusammenhang mitzutheilen.

I. Ueber den Nachweis der Pentosen.

Ich beschränke mich in dieser Besprechung ausschliesslich auf den Harn, meine Angaben beziehen sich auf den

Es ist mir unerfindlich, woher Herr Fr. Müller seine Kenntniss hat, dass es sich bei meinen Untersuchungen um «so kleine Mengen Osazon handelte etc.». Aus meiner Angabe in der Berl. klin. Wochenschrift 1895, Nr. 17, hätte er eher das Gegentheil entnehmen können. In der That habe ich nicht unerhebliche Mengen in Händen gehabt. Von dem Osazon aus dem Harn des Falles W., um den es sich hier handelt, besitze ich jetzt nach Abschluss der Arbeit noch 1,674 g, abgesehen von der kleinen Quantität, welche beim Ausschütten des Präparates aus dem Glase, behufs Wägung, am Glase hängen geblieben ist. Ob mein Präparat hinreichend rein zur Analyse war, darüber steht ihm kein Urtheil zu, da er es nicht gesehen und geprüft hat, das Urtheil darüber muss mir allein überlassen bleiben. — Herr Fr. Müller hat ohne den geringsten Grund die Reinheit meines Präparates verdächtigt. Mir ist aus der Litteratur kein Beispiel eines solchen Vorgehens, wie es Herrn Fr. Müller beliebt hat, bekannt: ihm gebührt also hierin die Priorität; ob ihm das zum Ruhme gereicht, kann ich dem Urtheil der Fachgenossen überlassen.

natürlichen pentosehaltigen Harn und auf Lösungen von Xylose in Harn, da die Arabinose als stark rechtsdrehend nicht in Betracht kam und andere Pentosen mir nicht zur Verfügung standen. Die Xylose wurde in Concentrationen von 0,05—0,2 % angewendet. In allen Fällen diente derselbe, nicht mit Xylose versetzte, Harn zur Kontrolle. Absichtlich wählte ich normalen Harn von ca. 1020 spec. Gew., um die Bedingungen nicht zu günstig zu gestalten, was bei dünnem Harn der Fall gewesen wäre.

Von Reactionen kommen für den Nachweis in Betracht:

- 1) die Tollens'sche Reaction mit Phloroglucin-Salzsäure,
- 2) die Tollens'sche Reaction mit Orcin-Salzsäure,
- 3) die Probe mit Anilinacetat-Papier,
- 4) der Nachweis des Furfurols nach vorgängiger Destillation mit Salzsäure,
- 5) die Darstellung des Osazons.

1. Die Tollens'sche Reaction mit Phloroglucin und Salzsäure.

Nach Tollens¹⁾ gibt man die zu untersuchende Flüssigkeit, im vorliegenden Falle also den Harn, in ein Reagensglas von ca. $1\frac{1}{2}$ cm. Durchmesser bis zur Höhe von $2\frac{1}{2}$ —3 cm., fügt nach dem Augenmass das gleiche Volumen Salzsäure von 1,19 D und 20 bis 30 mg Phloroglucin hinzu, erwärmt bis zum Auftreten kirschrother Färbung, bringt die Flüssigkeit sofort vor den Spalt des Spectralapparats und beobachtet, ob der für Pentose charakteristische Streifen zwischen den Linien D und E vorhanden ist.

Verfährt man genau nach dieser Vorschrift, so gelingt es sehr häufig, den charakteristischen Streifen zu sehen; es ist dabei wichtig, von vornherein nicht zu stark zu erhitzen, sonst wird die Farbe der Flüssigkeit bei irgend stärkerem Pentosegehalt sofort so intensiv, dass das ganze Spectrum mit

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 29, S. 1204.

Ausnahme von Roth und Orange absorbirt ist, ein Verhalten, welches natürlich nicht charakteristisch ist. In jedem Falle aber, mag man stärker oder schwächer erhitzt haben, trübt sich die Flüssigkeit so schnell, dass jeder weiteren Beobachtung dadurch ein Ende gemacht wird. Jeder, der die Untersuchung einmal ausführt, wird das Bedürfniss empfinden, die Spectralerscheinungen fixiren zu können. Ich habe hierzu die Ueberführung des Farbstoffs in Amylalkohol empfohlen.¹⁾ Diese gelingt leicht bei gelindem Schütteln der rothgefärbten Probe mit etwa dem gleichen Volumen Amylalkohol. Es ist dabei nothwendig, die Probe vorher durch Einsetzen in Wasser gut abzukühlen; macht man einen blinden Versuch mit Phloroglucin und Salzsäure von etwa 1,10 D und schüttelt die Probe heiss mit Amylalkohol, so färbt sich dieser dunkelgelb, kühlt man die Flüssigkeit aber vor dem Schütteln mit Amylalkohol gut ab, so nimmt derselbe nur wenig Farbstoff auf. Das Spectrum ist im letzteren Falle kaum verdunkelt, im ersteren dagegen von Grün nach Violett hin sehr stark.

Der charakteristische Streifen hält sich in der amyloalkoholischen Lösung lange, selbst bis zum nächsten Tage, und kann in aller Ruhe untersucht werden. Meistens ist der Amylalkohol so stark gefärbt, dass das ganze Spectrum mit Ausnahme von Roth und Orange absorbirt ist; man giesst dann zweckmässig etwas von dem gefärbten Amylalkohol ab und verdünnt ihn durch weiteren Zusatz von Amylalkohol.

Statt mit Amylalkohol auszuschütteln, kann man auch mit Eisessig verdünnen resp. die gefärbte trübe Harnprobe in Eisessig eingiessen; die Resultate sind wohl ganz dieselben. Abzukühlen ist hierbei nicht erforderlich.

Stellt man die Probe mit normalem Harn an, so tritt eine so ausgeprägte Rothfärbung wie mit dem Pentoseharn nicht ein, aber doch stets eine röthliche Färbung. Bei der Spectraluntersuchung zeigt sich nicht selten ein schwacher Absorptionsstreifen, in seltenen Fällen ein etwas ausgeprägterer Streifen. Aehnliche Angaben haben verschiedene Beobachter gemacht.

1) Centralbl. f. d. med. W. 1892, Nr. 32.

Ebstein¹⁾ sah unter 22 Harnen den Absorptionsstreifen 14 Mal, Cremer²⁾ hat, einen einzigen Fall ausgenommen, mit normalem Harn stets positive Reactionen erhalten, Külz und Vogel³⁾ fanden bei der Anstellung der Phloroglucinreaction an 80 Harnen nur 4, welche keine positive Reaction gaben; in 12 Fällen war der Ausfall der Prüfung schwach oder zweifelhaft, während in den übrigen 64 Harnen eine, nicht immer gleich deutliche, aber stets sicher wahrnehmbare, Rothfärbung sowie ein Absorptionsstreifen im Spectrum zwischen Gelb und Grün zu beobachten war.

Alle Autoren führen diese Reactionen auf die Spuren von Pentosen zurück, welche als solche oder in Form der Anhydride in der Nahrung sehr verbreitet sind. Külz und Vogel konnten (l. c. S. 188) «in verschiedenen Milchsorten, in Thee, Kaffee, vielen Weinen und Zuckerarten durch die Tollens'sche Reaction Pentose deutlich nachweisen». Da Ebstein die Ausscheidung unveränderter Xylose schon nach Einnahme von 0,05 g derselben constatiren konnte, so ist sehr wohl möglich, dass in normalem Harn vorkommende Pentose aus dieser Quelle stammt. Auf die Frage, ob die schwachen Reactionen des normalen Harns nothwendiger Weise auf Pentose bezogen werden müssen, gehe ich weiter unten noch ein.

Etwas später, als meinerseits die Anwendung von Amylalkohol empfohlen wurde, hat Tollens,⁴⁾ gleichfalls von dem Wunsche geleitet, die Spectralerscheinungen ungestört durch die eintretenden Trübungen beobachten zu können, seine sogenannte «Absatzmethode» publicirt. Die mit Phloroglucin und Salzsäure in den angegebenen Verhältnissen gemischte Flüssigkeit wird bis zum beginnenden Sieden erhitzt und nach 2—3 Minuten abgekühlt, der dabei entstandene Niederschlag wird abfiltrirt, ausgewaschen und auf dem Filter mit Alkohol übergossen; das rothgefärbte Filtrat gibt direkt oder nach angemessener Verdünnung den Absorptionsstreifen, welcher nunmehr haltbar ist.

1) Virchow's Arch. Bd. 129, S. 401.

2) Zeitschr. f. Biolog. Bd. 29, S. 54.

3) Zeitschr. f. Biolog. Bd. 32, S. 185.

4) Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 29, S. 1202.

Tollens zieht dieses Verfahren der Ausschüttelung mit Amylalkohol vor, weil der Amylalkohol auch gelb und braun gefärbte Substanzen aufnehme, während bei der Absatzmethode zwar auch störende Substanzen in Lösung gehen könnten, aber doch in bei Weitem nicht so hohem Grade, das Spectrum jedenfalls reiner sei. Das kann im Allgemeinen als richtig zugegeben werden. Amylalkohol nimmt auch aus mit Salzsäure allein ohne Phloroglucinzusatz erhitztem Harn theils präformirte, theils neu entstandene Farbstoffe auf; vor dem durch die Einwirkung heisser phloroglucinhaltiger Salzsäure auf den Amylalkohol entstehenden Farbstoff kann man sich, wie bereits erwähnt, dadurch schützen, dass man die Probe nicht heiss, sondern erst nach der Abkühlung mit Amylalkohol schüttelt. Insofern ist also die Absatzmethode besser; leider ist es mir jedoch bei geringem Pentosegehalt einigemal passirt, dass das Verfahren versagte, ohne dass es mir gelungen ist, die Ursache des Misserfolges zu entdecken. Von entscheidender Bedeutung ist dieses allerdings nicht, da man sich im concreten Falle doch nicht auf die Anstellung einer einzelnen Probe beschränken, sondern sie bei negativem Ausfall wiederholen wird.

Die ausserordentliche Empfindlichkeit der Phloroglucin-Reaction bei Anwendung reiner Lösungen von Pentosen und die Störungen, welche die Gegenwart von Harnbestandtheilen unzweifelhaft verursacht, hat mich, gleich als ich die Pentosurie aufgefunden hatte, auf den Gedanken gebracht, die Reaction etwas anders anzustellen, nämlich unter Verwendung von sehr wenig Harn. Dieses Verfahren hat sich auch weiterhin sehr gut bewährt, ich habe es nur dahin abgeändert, dass ich nicht mehr Salzsäure von 1,19 D, sondern solche von 1,12 anwende, ferner die Spectraluntersuchung hinzunehme, welche ja nach den Untersuchungen von Tollens jetzt als unentbehrlicher Theil der Reaction anzusehen ist. Das Verfahren ist nunmehr folgendes.

Man löst eine kleine Messerspitze Phloroglucin unter Erwärmen in 7—8 ccm. Salzsäure von 1,12 D, theilt die Lösung in zwei etwa gleiche Hälften, kühlt durch Einsetzen in kaltes Wasser ab, setzt zu einer Hälfte dann 0,5 ccm. (10—11 Tropfen) des zu prüfenden Harns, zu der anderen ebensoviel normalen

Harn von nicht zu geringer Concentration und setzt beide Reagensgläser in ein Becherglas, welches bis zum Sieden erhitztes Wasser enthält; in wenigen Augenblicken färbt sich die pentosehaltige Mischung roth, während die andere so gut wie unverändert bleibt, jedenfalls nicht roth wird. Die sofort nach Eintritt der Rothfärbung vorzunehmende Spectraluntersuchung ergibt den charakteristischen Absorptionsstreifen, wenn auch naturgemäss nicht so stark, wie bei dem anderen Verfahren, dafür ist das ganze Spectralbild reiner, weil es nicht durch andere Farbstoffe beeinträchtigt ist. Der Absorptionsstreifen ist ebenso vergänglich, auch hier dementsprechend die Ausschüttelung mit Amylalkohol empfehlenswerth.

Es empfiehlt sich übrigens, die Spectraluntersuchung an einer gesonderten Probe vorzunehmen, welche man zweckmässig, wie auch Tollens empfiehlt, direkt über der Beleuchtungsflamme gelind erhitzt, bis sich die erste Rothfärbung zeigt; die Reaction geht dann von selbst weiter.

Ich will grade nicht sagen, dass ich diese Art der Anstellung der Reaction allen andern vorziehe, sie ist aber jedenfalls sehr brauchbar. An normalem Harn habe ich diese Reaction nie eintreten sehen.

Ist nun der positive Ausfall der Tollens'schen Phloroglucinreaction direct für Pentosen beweisend? Diese Frage hat schon Tollens¹⁾ behandelt und unter Anwendung der «Absatzmethode» gefunden, dass Dextrose, Lävulose, Rohrzucker, Galactose, Milchzucker, Raffinose, Mannose, Rhamnose keine Reaction gaben, während bei direkter Beobachtung Galactose, Milchzucker und Rhamnose eine Andeutung von Absorptionsstreifen zeigten. Nach dem Amylalkoholverfahren gaben 1%ige Traubenzucker- und Milchzuckerlösungen — stärkere Lösungen kommen nicht in Betracht — allerdings gelb bis orange gefärbte Amylalkoholauszüge mit undeutlichem Absorptionsstreifen. Von der Glycuronsäure hat Tollens schon früher angegeben, dass sie die Reaction gibt. Meine eigenen Beobachtungen haben Folgendes ergeben:

1. Lösung von Glycuronsäure selbst (nach der Drehung

¹⁾ Ber. d. d. chem. G. Bd. 29, S. 1207.

etwa 0,5%; aus Euxanthinsäure dargestellt, jedoch nicht vorher krystallisirt) gab die Tollens'sche Reaction ganz ebenso wie Pentose;

2. dasselbe gilt für Lösungen von urochloralsaurem Natron und Phenylglycuronsäure;¹⁾

3. Nach Mentholgebrauch entleerter Harn, mehr oder weniger stark linksdrehend, gab die Reaction in ganz unzweifelhafter Weise;

4. dasselbe gilt für den Harn nach Chloralgebrauch.

Daraus geht hervor, dass Vorsicht bei der Verwerthung der Phloroglucinreaction zu Schlussfolgerungen geboten ist; so könnte auch die Andeutung der Reaction in normalem Harn vielleicht auf der Gegenwart von gepaarten Glycuronsäuren beruhen.

Die Angabe von Ebstein, dass kleine Mengen von Eiweiss die Reaction nicht stören, sowie dass die Behandlung von stark gefärbtem Harn mit Bleiessig oder Kohle oft vortheilhaft ist, kann ich bestätigen.

2. Die Orcinreaction.²⁾

Erhitzt man die Lösung einer Pentose mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure und etwas Orcin statt Phloroglucin, so erhält man eine blauviolette Färbung, bei der spectroscopischen Untersuchung einen Absorptionsstreifen zwischen den Linien C und D. Die heisse Lösung trübt sich nach einiger Zeit unter Ausscheidung eines bläulichen Farbstoffes.

Führt man die Reaction an pentosehaltigem Harn aus, so sind die Farbenerscheinungen etwas andere. Eine Roth- oder Violett-färbung ist nicht oder nur vorübergehend zu bemerken, es tritt vielmehr sehr bald grünliche Färbung auf, nur gegen eine leuchtende Gasflamme bei durchfallendem Licht

¹⁾ Beide Präparate verdanke ich der Güte des verstorbenen Collegen E. Külz.

²⁾ Tollens Kohlehydrate in Ladenburgs Handwörterbuch der Chemie Bd. XIII S. 669. — Die Probe rührt ursprünglich von C. Reichl her, Tollens und Allen haben statt der ursprünglich angewendeten Schwefelsäure die Salzsäure eingeführt. Vgl. hierüber F. Reinitzer. Diese Zeitschr. Bd. XIV, S. 453 ff.

betrachtet, hat die Flüssigkeit einen röthlichen Schein. Kühlt man den Harn ab, sobald beim Erhitzen Trübung eingetreten ist, und schüttelt dann gelind mit Amylalkohol, so nimmt derselbe eine gesättigt grüne Farbe an. Die Nuance der Färbung ist etwas wechselnd, je nach der Quantität der Pentose von hellgrün, grasgrün, smaragdgrün bis blaugrün.

Auch bei ein und derselben Lösung fällt die Färbung nicht immer ganz gleich aus. Die grünefärbten Lösungen zeigen einen gut ausgebildeten Absorptionsstreifen, entsprechend der Angabe Tollens, mitunter tritt neben diesem Streifen noch ein zweiter schwacher Absorptionsstreifen mehr nach dem Roth des Spectrums hin auf; dieser Streifen ist jedoch ganz inconstant.

Ich bemerke noch, dass man die Probe vor dem Schütteln mit Amylalkohol nur soweit abkühlen darf, dass sie noch lauwarm ist, und nicht längere Zeit verstreichen lassen darf, ehe man mit Amylalkohol schüttelt; in diesem Falle erhält man öfters keine Grünfärbung des Amylalkohols, sondern eine mehr röthliche Färbung, und keinen so guten Absorptionsstreifen. Der Amylalkohol setzt sich oft schwer ab; man kann das Absetzen durch gelindes Erwärmen befördern, muss sich aber vor zu starkem Erhitzen hüten, weil unter diesen Umständen der Amylalkohol auch eine leichte grünliche Färbung annehmen kann, wenn man nur Orcin mit Wasser und Salzsäure erhitzt hat. Allerdings ist diese Grünfärbung sehr blass und der Amylalkoholauszug zeigt auch keinen charakteristischen Absorptionsstreifen, sodass ein Irrthum dadurch schwerlich verursacht werden kann. Ganz besonders schön verläuft die Reaction bei Anwendung von durch Thierkohle entfärbtem Pentoseharn.

Statt mit Amylalkohol auszuschütteln, kann man ebenso wie bei der Phloroglucinreaction auch die trüb gewordene Probe mit Eisessig versetzen bzw. in solchen hineingiessen; man erhält dann eine lebhaft grünefärbte klare Lösung. Auch für die Orcinprobe haben Tollens und Allen¹⁾ die Absatzmethode in derselben Form wie bei der Phloroglucinprobe empfohlen; ich habe hierüber keine Erfahrungen.

1) Annal. der Chemie und Pharmacie. Bd. 260, S. 305.

Um vielleicht Anhaltspunkte zur Unterscheidung dieser Pentose-Reaction von ähnlichen, von welchen gleich die Rede sein wird, zu gewinnen, habe ich noch eine Anzahl anderer Lösungsmittel versucht, jedoch ohne entscheidende Resultate. Dennoch scheint es mir nicht überflüssig, die Ergebnisse ganz kurz aufzuführen. Bezüglich der Anstellung der Reaction bemerke ich noch: Es wurden stets ca. 0,5 ccm. bei Zimmertemperatur gesättigte Orcinolösung, 4—5 ccm. Harn und ebensoviel rauchende Salzsäure gemischt, bis zum Eintritt der Färbung und beginnenden Trübung erhitzt, dann abgekühlt, dann mit dem betreffenden Lösungsmittel geschüttelt. Bei vielen Lösungsmitteln schied sich ein grüngelblicher unlöslicher Niederschlag in mehr oder weniger reichlicher Quantität aus, meistens an der Berührungsgrenze der beiden Flüssigkeiten. Ich bezeichne ihn im Folgenden als U.S. = «Unlösliche Substanz».

1. Aether: Auszug farblos, bläulich fluorescirend, kein Streifen. Wässrige Flüssigkeit grünlich-gelb, Streifen im Roth vorhanden. U. S. fehlend oder gering.

2. Essigäther: Auszug farblos oder schwachgrün, mehr oder minder stark bläulich fluorescirend. kein Streifen. Wässrige Flüssigkeit gelb, Streifen mehr oder weniger ausgeprägt. U. S. nicht vorhanden.

3. Petroleumäther: Auszug farblos, kein Streifen. Wässrige Flüssigkeit gelb, trüb, kein Streifen. U. S. reichlich.

4. Benzol: Verhalten wie beim Petroleumäther.

5. Chloroform: Desgl., nur mitunter das Chloroform schwach bläulich.

Es fragt sich nun, ob der Orcinreaction vielleicht eine grössere Beweiskraft zukommt, wie der Phloroglucinreaction. Für den Harn kommen in dieser Beziehung in Betracht: Traubenzucker, Milchzucker und die Glycuronsäure bzw. gepaarte Glycuronsäure. Meine Versuche haben in dieser Beziehung Folgendes ergeben:

1. Durchaus negativ verhalten sich Milchzucker und Traubenzucker in 1%iger Lösung. In beiden Fällen färbt sich die Lösung nicht violett oder grün, sondern gelb; beim Erkalten tritt ganz schwache Trübung ein. Der Amylalkoholauszug ist in beiden Fällen schwach hellgelb, zeigt keinen Streifen.

2. Positiv verhält sich freie Glycuronsäure (in ca. 0,5%iger wässriger Lösung). Auch das Verhalten der Probe zu den angegebenen Lösungsmitteln stimmt vollständig mit dem für die Pentosen beschriebenen überein, nur mit dem Unterschied, dass

hier die Farbenerscheinungen etwas reiner waren, weil die störende Gelbfärbung des Harns fortfiel. Es ist überflüssig, die Reactionen noch einmal zu beschreiben.

3. Urochloralsäures Natron in wässriger Lösung gab nur schwierig Reaction, der Streifen war schwach.

4. Phenylglycuronsäure in wässriger Lösung zeigte erst nach minutenlangem heftigen Kochen mit Orcin und Salzsäure Spuren einer röthlichen, allmählich bläulich werdenden Färbung, dann Trübung, der Amylalkohol war ganz schwach bläulich gefärbt, bei durchfallendem Licht gegen eine leuchtende Gasflamme betrachtet aber röthlich. Der Amylalkohol war (nach Erwärmen behufs besserer Trennung) grünlich und zeigte einen schwachen Absorptionsstreifen.

5. In demselben nach Menthol- bzw. Chloralgebrauch entleerten Harn, welcher mit Phloroglucin eine ganz unzweifelhafte Reaction gab, konnte mit Orcin kein positives Resultat erhalten werden.

Woran es liegt, dass die gepaarten Glycuronsäuren die Orcinreaction sehr viel schwieriger geben als die Phloroglucinreaction, ja im Harn gar nicht, ist schwer zu sagen, eine geringere Empfindlichkeit der Orcinreaction kann der Grund nicht sein, die Orcinreaction scheint mir ebenso fein zu sein wie die Phloroglucinreaction.

Jedenfalls scheint es, dass man bei Anstellung der Orcinreaction weit mehr vor Verwechslung von Pentosen mit gepaarten Glycuronsäuren gesichert ist, wie bei der Phloroglucinreaction. Dazu kommt noch, dass die Farbenerscheinungen weit schöner sind; für klinische Zwecke möchte also die Orcinreaction vorzuziehen sein. Ob in der That die gepaarten Glycuronsäuren im Harn niemals die Orcinreaction der Pentosen vortäuschen, können freilich nur ausgedehntere Untersuchungen ergeben, die naturgemäss Aufgabe eines klinischen Laboratoriums sind.

In normalem Harn habe ich die Orcinreaction niemals bekommen, jedenfalls nicht sicher, selbst in solchen nicht, die eine nicht zu bezweifelnde Phloroglucinreaction gaben. Dieses Verhalten würde dafür sprechen, dass die Phloroglucinreaction in normalem Harn nicht auf Gehalt an Pentosen, sondern an

gepaarten Glycuronsäuren beruht; entscheidend ist es natürlich nicht.

Ich ziehe also die Orcinreaction in Anbetracht des Umstandes, dass bei der Phloroglucin-Amylalkoholreaction stets Farbstoffe entstehen, welche zuweilen, namentlich bei minder sorgfältigem Arbeiten, sehr stören können, bei der Orcinreaction nicht oder nur in sehr beschränktem Umfange, sowie dass die Orcinreaction mit Traubenzucker, Milchzucker und normalem Harn nicht, mit gepaarten Glycuronsäuren nur sehr schwierig und unvollständig eintritt, der Phloroglucinreaction zum Nachweis der Pentosen im Harn vor.

3. Die Reaction mit Anilinacetat-Papier.

Versetzt man einen pentosehaltigen Harn mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure, erhitzt zum Sieden und schiebt in das Reagensglas einen mit Anilinacetat getränkten Filtrirpapierstreifen, so färbt sich das Papier durch das sich entwickelnde Furfurol sehr schnell lebhaft kirschroth. Die Reaction ist neben anderen Reactionen sehr wohl zu brauchen und hat vor der Phloroglucinreaction einige Vorzüge. Freie Glycuronsäure gibt die Reaction stark, Urochloralsäure und Phenylglycuronsäure nicht merklich, ebenso nicht Menthoharn. Zu weiteren Untersuchungen mit Harn hatte ich keine Gelegenheit. Milchzucker und Traubenzucker in 1%iger Lösung geben die Reaction nicht, höchstens eine zweifelhafte Rothfärbung an den Rändern des Papierstreifens.

4. Der Nachweis des Furfurols nach vorgängiger Destillation.

Da normaler Harn bei der Destillation mit Salzsäure, soviel bisher bekannt, jedenfalls nur äusserst wenig Furfurol liefert, Pentose aber reichlich, so liegt es sehr nahe, um sich von allen störenden Harnbestandtheilen zu befreien, den Harn nicht direkt auf Pentose zu untersuchen, sondern vorher mit Salzsäure zu destilliren. Im Destillat kann dann auch das Furfurol quantitativ bestimmt werden. Es wurden 200 ccm. Harn mit 200 ccm. Salzsäure von 1,12 D so lange destillirt, bis das Volumen des Destillates 200 ccm. betrug. Die Verhältnisse

entsprechen dem von Tollens angegebenen Destilliren der auf Pentosen oder Pentosazon zu untersuchenden Substanz mit Salzsäure von 1,06 D, jedoch war es in keinem Falle, wie dies Tollens für die quantitative Bestimmung der Pentosen vorschreibt, erforderlich, wiederholt Salzsäure in den Destillirkolben zu geben und aufs Neue zu destilliren, vielmehr befindet sich, wie ich mich durch wiederholte Versuche überzeugt habe, in den ersten 200 ccm. Destillat schon alles Furfurol, welches überhaupt aus pentosehaltigem Harn zu erhalten ist. Für den qualitativen Nachweis ist es auch gar nicht einmal nöthig, soviel abzudestilliren.

Die Prüfung dieses Verfahrens an Pentoseharn, normalem Harn und einigen anderen hat Folgendes ergeben:

I. Destillat aus genuinem Pentoseharn.

1. Das Destillat gibt bei Zusatz des halben Volumens rauchender Salzsäure und etwas in Salzsäure gelösten Phloroglucins einen dicken blauen Niederschlag von Phloroglucid.

2. Bei Anstellung der Reaction mit Orcin sehr schnell Grünfärbung, Trübung, Bildung eines grünlich-blauen Niederschlages, der sich in Amylalkohol mit blaugrüner Farbe löst. Die Färbung ist von ausserordentlicher Schönheit, der Streifen ausgeprägt.

3. Das Destillat färbt mit Anilinacetat getränktes Filtrirpapier intensiv roth.

4. 1 ccm. färbt sich mit einem Tropfen methylalkoholischer α -Naphthollösung und reiner concentrirter Schwefelsäure versetzt intensiv kirschroth. Die mit Eisessig verdünnte Probe ist intensiv purpurfarben und absorbiert das ganze Spectrum mit Ausnahme von Roth und Orange; bei weiterer Verdünnung mit Eisessig zeigt sich ein starker Streifen zwischen Grün und Gelb. Die Lösung verblasst bald. Verdünnt man die Probe statt mit Eisessig mit Amylalkohol, so erscheint dieser anfangs intensiv kirschroth, die Färbung verschwindet bald, die Mischung behält jedoch bleibend eine schwärzliche bzw. grünliche Färbung, bzw. der Amylalkohol allein zeigt diese Färbung, wenn man zuerst hinreichend mit Wasser verdünnt und dann mit Amylalkohol geschüttelt hatte.

4. Bei Zusatz von NH_3 , AgNO_3 , NaHO tritt sehr schnell Bräunung, dann Schwärzung und Ausscheidung von metallischem Silber ein.

II. Destillat aus normalem Harn

zeigte gegen dieselben Reagentien folgendes Verhalten:

1. Das Destillat färbt sich intensiv gelb, dann olivenfarben, grünlich, erst nach längerem Stehen scheiden sich einige bläulich gefärbte Flocken aus.

2. Bei manchen Harnen ganz negativ, bei anderen grünliche Färbung, leichte Trübung. Amylalkohol in diesem Falle hellgrün; schwacher, aber unzweifelhafter Streifen.

3. Keine Reaction.

4. Die Reaction mit α -Naphthol und Schwefelsäure ist ziemlich intensiv. Einen merklichen Unterschied zeigt die mit Amylalkohol verdünnte Probe, sie ist nicht schwärzlich gefärbt, sondern nur ganz schwach grau.

5. Anfangs nichts, erst allmählich leichte graue Färbung.

III. Destillat aus 200 ccm. eines 0,2% Xylose enthaltenden Harns verhält sich genau so wie Nr. I.

IV. Destillat von nach Mentholgebrauch entleertem Harn.

1. Im Wesentlichen wie normaler Harn, jedoch stärkere grünliche Färbung und Ausscheidung von bläulichen Flöckchen etwas stärker.

2. Orcinreaction schwach positiv, Absorptionsstreifen schwach, aber unzweifelhaft.

3. 4. 5. Wie bei normalem Harn.

Weitere Harne mit einem Gehalt von gepaarter Glycuronsäure hatte ich nicht Gelegenheit zu untersuchen.

V. Destillat aus 200 ccm. mit 1% Milchzucker versetztem Harn.

Orcinreaction schwach positiv, im Uebrigen wie normaler Harn.

VI. Destillat aus 10 g Traubenzucker, 200 g Wasser, 200 g Salzsäure von 1,12 D gibt keine Furfurolreaction.

Daraus geht hervor, dass, wie nicht anders zu erwarten war, die Destillation mit Salzsäure sehr wohl zur Erkennung der Gegenwart abnormer furfurolbildender Substanzen im Harn dienen kann, wenn man von spurenweise auftretenden Reactionen absieht. Selbstverständlich brauchen diese nicht Pentosen zu sein, es können namentlich auch gepaarte Glycuronsäuren sein. Ueber die Natur der furfurolbildenden Substanz muss dann die weitere Untersuchung entscheiden. Es würde sich wohl der Mühe verlohnen, vergleichende Untersuchungen an klinischem Beobachtungsmaterial anzustellen, vielleicht unter Ausbildung einer colorimetrischen Methode mittelst der Reaction mit Orcin. Die Vollständigkeit und Leichtigkeit, mit welcher der gebildete Farbstoff vom Amylalkohol aufgenommen wird, lässt einen Versuch in dieser Richtung nicht aussichtslos erscheinen, umso mehr, als auch die Nuance der Färbung —

anders wie im Harn direkt — eine sehr constante zu sein scheint.

5. Die Darstellung des Pentosazons.

Um das Pentosazon von vornherein möglichst rein und in möglichst charakteristischer Form zu erhalten, verfährt man nach meinen Erfahrungen am besten folgendermassen:

In ein Becherglas von ca. 400 ccm. Inhalt gibt man 5 g Phenylhydrazin, dann soviel Essigsäure, dass die Mischung sauer reagirt, oder nach Emil Fischer eine gleiche Quantität 50%iger Essigsäure, dann 200 ccm. Harn, mischt gut durch, erhitzt Anfangs auf dem Drahtnetz (jedoch nicht bis zum Sieden), dann noch eine Stunde auf dem Wasserbad oder im Wasserbad, filtrirt heiss durch einen vorher erhitzten Trichter oder Heisswassertrichter unter Anwendung schnell filtrirenden Papiers in ein Becherglas, kühlt durch Einsetzen in kaltes, ab und zu gewechseltes, Wasser ab und filtrirt ab, sobald die Mischung erkaltet ist und breiige Consistenz angenommen hat. Legt man Werth darauf, besonders gut ausgebildete Krystallisation zu erhalten, so setzt man das Becherglas wieder in ein siedendes Wasserbad, erhitzt noch einige Minuten, löscht dann die Flamme, bedeckt das Becherglas und lässt das Wasserbad bis zum nächsten Tage unberührt stehen. Das so dargestellte Osazon pflegt nicht ganz so rein zu sein.

Nach dem Abfiltriren und Auswaschen des Niederschlages breitet man das Filter auf einer Filtrirpapierunterlage aus und lässt an der Luft trocknen und kann nun unter Umständen schon ohne weitere Reinigung den Schmelzpunkt bestimmen. Ob das Osazon hierzu rein genug ist, lässt sich nach der äusseren Erscheinung beurtheilen — es bildet in reinem Zustande eine papierartig zusammenhängende, citronengelbe, aus ineinander verfilzten Nadeln bestehende Masse — und nach dem Ergebniss der mikroskopischen Untersuchung. Besser ist es, das Osazon zur Schmelzpunktbestimmung umzukrystallisiren, und das ist jedenfalls nothwendig, wenn sich bei der mikroskopischen Untersuchung — welche man zweckmässig so ausführt, dass man etwas von der noch breiförmigen feuchten Masse entnimmt — ausser den langgestreckten Nadeln des Osazons noch ölige Tropfen oder anderweitige amorphe Beimischungen zeigen. Zum Umkrystallisiren lässt man das Osazon natürlich nicht ganz trocken werden, da es sich dann sehr schwer in heissem Wasser löst, sondern wartet den

Zeitpunkt ab, in welchem es sich gut vom Filter ablösen lässt, was bei einem gewissen Grade der Trockenheit der Fall ist, oder wendet es auch ganz feucht an. Das Umkrystallisiren geschieht bei kleinen Quantitäten zweckmässig nur aus heissem Wasser, bei grösseren Quantitäten ist dies etwas unbequem, da 1 g Osazon ca. 1 Liter heisses Wasser zur Lösung braucht; man benutzt dann zweckmässig alkoholhaltiges Wasser. etwa 5 ccm. absoluten Alkohol auf 100 ccm. Wasser. Auf 1 g ziemlich trockenes Osazon sind dann nur etwa 150 ccm. des Gemisches erforderlich, doch kann man ohne Schaden auch mehr nehmen. Beim Kochen entweicht ein Theil des Alkohols, sodass es kaum nöthig ist, aus dem heissen Filtrat den Alkohol noch zu entfernen, aus demselben scheidet sich vielmehr das Osazon sofort aus. Für die Analyse krystallisirt man das Osazon, am besten in kleinen Portionen, noch ein oder mehrere Male um. Sehr zweckmässig ist es auch, das völlig lufttrockene Präparat noch einmal mit reinem Aether zu waschen, für aus Harn dargestellte Präparate allerdings kaum erforderlich.

Der Schmelzpunkt des möglichst gereinigten Osazons liegt bei 159—160°, einige Mal wurde er sogar noch ein wenig höher gefunden; aber auch ein etwas niedrigerer Schmelzpunkt — etwa bei 156° — ist noch durchaus charakteristisch, natürlich nur für das Vorkommen im Harn; der Schmelzpunkt des nicht umkrystallisirten Osazons kann bis 10° unter dem richtigen Werth liegen. Vor einer Verwechslung mit Glucosazon schützt 1. die weit grössere Löslichkeit des Pentosazons. Während sich das Glucosazon schon während des Erhitzens ausscheidet, habe ich dieses bei dem Pentosazon aus Harn nie beobachtet. 2. Der Schmelzpunkt. Man darf von dem aus zuckerhaltigen Harn dargestellten, nicht umkrystallisirten Osazon allerdings nicht den richtigen Schmelzpunkt erwarten, aber er liegt doch stets erheblich höher, als der des Pentosazons. Herr Dr. C. Eckart, jetzt in Nürnberg, hat seiner Zeit auf meinen Wunsch aus einer Anzahl diabetischer Harne unter Anwendung recht kleiner Mengen — 10 ccm. — das Osazon dargestellt und den Schmelzpunkt bestimmt. Derselbe lag zwischen 173 und 194°, von einer Verwechslung kann also nicht die Rede sein. Ebenso wenig können die bei der Einwirkung von Phenylhydrazin auf Glycuronsäure entstehenden Verbindungen in Frage kommen, ganz abgesehen davon, dass freie Glycuronsäure noch nie im Harn gefunden worden ist. Vor Verwechslung schützt der äussere

Habitus der Glycuronsäureverbindung, welche nach Thierfelder¹⁾ eine hellgelbe, amorphe Masse darstellt, während das Pentosazon stets krystallinisch erhalten wird, und der Schmelzpunkt der Verbindung, welcher nach ihm bei 114–115° liegt.

II. Der Nachweis der Pentose neben Traubenzucker.

Inwieweit der Nachweis der Pentose etwa durch irgend welche pathologische Harnbestandtheile gestört werden könnte, müssen weitere Erfahrungen zeigen: an dieser Stelle schien es mir genügend, den Einfluss des Traubenzuckers hierauf zu besprechen, da in dem einen der von mir beobachteten Fälle eine Zeit lang thatsächlich Traubenzucker neben Pentose vorhanden war, und ebenso in dem von Reale beschriebenen Falle. Was den Nachweis durch Reactionen betrifft, so wurde die Phloroglucinreaction durch Traubenzucker sehr gestört, die Anilinacetatprobe nicht merklich, die Orcinprobe jedenfalls nur unerheblich. Es wurde in 20 ccm. eines pentosehaltigen Harns (der Harn III des später zu erwähnenden Falles M) 1 g Traubenzucker gelöst = 5%; die Reactionen waren sehr stark. Weiterhin wurden gemischt: 1) 5 ccm. desselben Harns mit 15 ccm. normalen Harns und 2) 5 ccm. desselben Harns mit 15 ccm. normalen Harns + 1 g Traubenzucker = 5%. Die Reactionen waren in beiden Mischungen unzweifelhaft, aber in der zuckerhaltigen die Orcinreaction etwas weniger rein.

Auf den Nachweis des Furfurols nach vorgängiger Destillation mit Salzsäure übt die Gegenwart von Traubenzucker, wie kaum erwähnt zu werden braucht, keinen Einfluss.

Was den Nachweis der Pentose neben Traubenzucker durch Bildung des Osazons betrifft, so habe ich schon in meiner ersten in Gemeinschaft mit M. Jastrowitz²⁾ gemachten Mittheilung erwähnt, dass die verschiedene Löslichkeit der Osazone die Möglichkeit bietet, beide Körper neben einander zu erkennen. In einem Versuch wurden 20 ccm. eines Pentoseharns und 20 ccm. eines diabetischen Harns von 0,8% Traubenzucker-

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XI, S. 395.

2) Centralbl. f. d. m. W., 1892, Nr. 19.

gehalt gemischt, das Osazon dargestellt und mit 45 ccm. heissen Wassers behandelt; ein Theil löste sich auf, ein anderer nicht. Der unlösliche Antheil schmolz nach dem Trocknen bei 200° , aus der Lösung schied sich ein Osazon vom Schmelzpunkt 172° in Nadeln aus. Der Schmelzpunkt des unlöslichen Antheils erhöhte sich bei der Reinigung auf 203° , der Traubenzucker war damit nachgewiesen. Der Schmelzpunkt des löslichen Antheils erniedrigte sich bei einmaligem Umkrystallisiren auf 165° , lag also dem Schmelzpunkt des Pentosazons nahe; eine weitere Reinigung gestattete die kleine Quantität nicht. Dieses Verfahren gelingt natürlich nur, wenn die Quantität des Traubenzuckers gegenüber der der Pentose nicht gar zu gross ist.

Für den Fall, dass die Quantität des Traubenzuckers grösser ist, habe ich empfohlen, denselben durch Gährung zu entfernen. Man lässt den Harn 2 Tage lang mit Hefe bei Brutwärme stehen, filtrirt und erhitzt vor der Behandlung einige Zeit zum Sieden, um den durch die Gährung entstandenen Alkohol wenigstens zum grössten Theil zu entfernen, welcher sonst bei der nachfolgenden Behandlung mit Phenylhydrazin auf etwa gebildetes Pentosazon lösend wirken und dadurch den Nachweis stören könnte. Nach diesem Verfahren gelang es regelmässig, in dem mit 5% Traubenzucker versetzten Pentoseharn die Pentose durch Darstellung des Osazons nachzuweisen, obwohl die Menge des Traubenzuckers auf reichlich 15 mal so hoch zu schätzen war, wie die der Pentose.

Damit steht nun eine Angabe von Külz und Vogel in Widerspruch. Diese Autoren sagen:¹⁾ «Die bis jetzt bekannten Zuckerarten von der Formel $C_5H_{10}O_5$ werden durch reine Bierhefe nicht in Gährung versetzt. Wir versuchten daher bei einigen Harnen, die starke Tollens'sche Reaction zeigten und reichliche Mengen des beschriebenen Osazons lieferten,²⁾ die Dextrose durch Vergähren zu beseitigen, in der Hoffnung, die Pentose dann leichter in der Form ihres Osazons abscheiden und charakterisiren zu können. Aus den Versuchen, welche allerdings

1) Zeitschr. f. Biol., Bd. 32, S. 188.

2) Nämlich vom Schmelzpunkt 158° etc.

mit gewöhnlicher Bierhefe ausgeführt wurden, ergab sich, dass auch die Pentose stets vollständig mit vergohren war.»

Dieser Widerspruch erklärt sich wohl durch die Mengenverhältnisse des Traubenzuckers und der Pentose. Als ich 20 ccm. Pentoseharn mit 180 ccm. gewöhnlichen Harns mischte und dann 5 g Traubenzucker in der Mischung auflöste, war ich allerdings auch nicht im Stande, die Pentose nach der Vergärung durch die Osazonbildung nachzuweisen. Dies gelang aber auch nicht sicher, als 20 ccm. desselben Pentoseharns mit 180 ccm. gewöhnlichen Harns vermischt und dann direkt verarbeitet wurden. Es bleibt also nach meinen Versuchen unentschieden, ob die zu geringe Quantität der Pentose oder Vergärung die Ursache davon war, dass der Nachweis nicht glückte.

Zweifellos ist es zum Nachweis sehr kleiner Mengen von Pentose im diabetischen Harn besser, das allerdings recht mühsame Verfahren von Külz und Vogel der Extraction grösserer Mengen des dargestellten Osazons mit Wasser von 60° C. anzuwenden.

III. Die von mir beobachteten Fälle von Pentosurie.

1. Fall W

In dem ersten in Gemeinschaft mit M. Jastrowitz beobachteten Falle handelte es sich um einen 29 jährigen Neurastheniker, welcher wegen Morphinummissbrauchs eine Entziehungscur durchmachte. An den ersten Tagen, an denen mir der Harn zur Verfügung stand, enthielt er gleichzeitig gährungsfähigen Zucker, später war dieses nicht mehr der Fall. Die Angaben beziehen sich nur auf die Zeit, in der der Harn zuckerfrei war. Die Pentosurie konnte wiederholt in Zeitpunkten constatirt werden, welche mehrere Monate auseinander lagen.

Die Analyse¹⁾ des Osazons ergab Folgendes:

1. 0,1152 g zuerst über Schwefelsäure, dann bei 80—85° getrocknet gab 0,2632 CO₂ und 0,0661 H₂O.

¹⁾ Diese Analysen sind bereits in d. Berl. Klin. Wochenschr. 1895 Nr. 17 veröffentlicht. Analyse 1 und 2 rühren von Dr. C. Eckart, jetzt in Nürnberg, Analyse 3 und 4 von Dr. Martin Hahn, jetzt in München, her.

2. 0,0764 g gab 10,8 ccm. N bei 14,7° C und 756 mm. Bar.
3. 0,1997 g bei 100—110° getrocknet gab 0,4589 CO₂ und 0,1149 H₂O.
4. 0,1981 g gab 30,7 ccm. N bei 24° C. und 759,9 mm. Bar.

	gefunden in Procenten		berechnet	berechnet
	I	II	für Phenylpentosazon	für Phenylglucosazon
C	62,31	62,67	62,19	60,23
H	6,37	6,38	6,09	6,12
N	17,77	17,47	17,07	15,47

Der Harn gab die Tollens'sche Phloroglucinreaction und lieferte beim Destilliren mit Salzsäure reichlich Furfurol, die anderen Reactionen sind nicht angestellt.

Nach dem Ausfall der Analysen und dem sonstigen Verhalten des Harns konnte kein Zweifel sein, dass derselbe Pentosen enthielt.

Was im Uebrigen die Eigenschaften des Harns betrifft, so zeigte er nach allen Richtungen normales Verhalten mit Ausnahme seiner reducirenden Eigenschaften. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1017 und 1025, die mikroskopische Untersuchung ergab keine abnormen Bestandtheile, Nucleoalbumin und Albumin waren nicht vorhanden.

1. Bei Anstellung der Trommer'schen Probe mit Natronlauge und Kupfersulfat löste der Harn verhältnissmässig wenig Kupferhydroxyd auf. Beim Erhitzen zum Sieden blieb die blaue Farbe zunächst fast unverändert, dann aber trat, häufig mit einem Schlage, Reduction und massenhafte Ausscheidung von gelbem Kupferoxydul ein, welches sich schnell absetzte. Die darüber stehende Flüssigkeit erschien bläulich und fast ganz klar, dennoch gelang es nicht, den Niederschlag ohne Verlust abzufiltriren, er ging stets theilweise durch das Filter. In anderen Fällen trat auch bei längerem Erhitzen keine Ausscheidung von Oxydul ein, sondern lediglich Gelbfärbung, Oxydulausscheidung erst nachträglich bei längerem Stehen. Weder im ersten noch im zweiten Fall ist das Verhalten des Harns charakteristisch; man beobachtet ganz dasselbe nicht selten auch an anderen einigermassen concentrirten Harnen, sowie an ganz schwach zuckerhaltigen. In durch Kohle entfärbtem Harn verläuft die Reaction nicht besser, Abfiltriren des Kupferoxyduls war auch hier nicht möglich.

Stellt man die Trommer'sche Probe nach dem Seegen'schen Kohleverfahren mit dem Waschwasser der Kohle an, so erhält man unzweifelhaft positive Resultate. Fällt man den Harn mit neutralem Bleiacetat und stellt die Probe mit Natronlauge + Kupfersulfat (oder -nitrat) direkt im Filtrat an, oder nachdem man das Blei durch H_2S , dieses durch einen CO_2 -Strom entfernt hat, so tritt die Reduction anscheinend ebenso stark auf, das Kupferoxydul ist aber gleichfalls nicht filtrirbar. Constant ist stets der zögernde Eintritt der Reaction.

Beim Erhitzen mit Fehling'scher Lösung färbte sich der Harn erst grün, dann gelblich, die Flüssigkeit zeigte starke Opalescenz, eine Ausscheidung von Oxydul trat jedoch nicht ein.

2. Die Nylander'sche Wismuthprobe fiel im Verhältniss zur Trommer'schen Probe sehr schwach aus, auch nach längerem Kochen war der entstandene Niederschlag nicht schwarz, sondern grau gefärbt.

3. Ammoniakalische Silberlösung wurde beim Erhitzen schnell und stark reducirt, jedoch schied sich das Silber nur in Form eines schwarzen Pulvers, auch wohl in Form zusammenhängender Häute aus, ein metallisch glänzender Spiegel wurde jedoch nicht erzielt, auch nicht bei gleichzeitiger Anwendung von Natronlauge.

4. Indigocarmin wird nach dem Alkalisiren mit Na_2CO_3 beim Erwärmen sehr stark reducirt.

5. Beim Erhitzen einiger Cubikcentimeter Harn mit einem Stückchen Kalihydrat tritt ziemlich lebhafte Reaction ein, jedoch färbt sich der Harn auch bei längerem Erhitzen nur orange. Beim Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure Caramelgeruch und Buttersäuregeruch bemerkbar.

6. Naphtolprobe in der von Treupel angegebenen Form der Ausführung.¹⁾ Ein Tropfen des Harns, mit $\frac{1}{2}$ ccm. Wasser und 1 Tropfen 10% iger methylalkoholischer α -Naphtollösung und 2 ccm. Schwefelsäure versetzt, gibt intensive Purpurfärbung. Auch in dem 10 fach verdünnten Harn ist die Reaction noch sehr deutlich, bei 20 facher Verdünnung wahrnehmbar.

7. Die Gährungsprobe verläuft negativ, der 48 Stunden mit Hefe digerirte Harn reducirt Kupferoxyd in alkalischer Lösung ebenso wie vorher.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XVI, S. 51.

8. Der Harn erwies sich als optisch inactiv oder vielleicht ganz minimal rechtsdrehend.

Auf die Versuche zur Darstellung der Pentose aus dem Harn brauche ich nicht einzugehen, da sie sämmtlich nicht zum Ziele führten, was bei der Geringfügigkeit des Gehaltes an Pentose nicht besonders Wunder nehmen kann.

Was die Mengeverhältnisse betrifft, so führten die Versuche, die Quantität der Pentose durch Reduction zu bestimmen, zu wenig befriedigenden Resultaten, entsprechend dem oben geschilderten Verhalten des Harns zu alkalischer Kupferlösung. Es gelang allerdings einigemal an dem mit basischem Bleiacetat, H_2S und CO_2 -Strom behandelten Harn das Kupferoxydul einigermaßen zurückzuhalten. Es wurde auf diesem Wege einmal ein scheinbarer Zuckergehalt¹⁾ von 0,474%, ein anderes Mal 0,514% ermittelt, jedoch sind diese Werthe nur als ganz grobe Annäherung zu betrachten, umsomehr, als ein Theil der Pentose — bald mehr, bald weniger — durch das basische Bleiacetat ausgefällt wird, andererseits auch das normale Reduktionsvermögen des Harns sehr wesentlich in Betracht kommt.

Einigen Anhalt gewährt die Quantität des erhaltenen Osazons. — 200 ccm. des Harns lieferten 0,362 g Osazon, einmal umkrystallisirt und anhaltend über Schwefelsäure getrocknet = 0,1811%. Unter der Annahme, dass die Pentose quantitativ in Osazon übergeht, was schwerlich ganz zutrifft, würde dieses nur 0,084% Pentose entsprechen.

Die Bestimmung der Pentose durch die Quantität des beim Destilliren mit Salzsäure erhaltenen Furfurols habe ich leider aufgeschoben in der Annahme, dass in dem mit Chloroform conservirten Harn die Pentose unverändert bleiben werde. In dieser Annahme habe ich mich aber getäuscht. 200 ccm. des jahrelang aufbewahrten Harns wurden mit 200 ccm. Salzsäure — 1,12 spec. Gewicht — destillirt und das Furfurol nach der Methode von Tollens und Krüger durch Fällung

¹⁾ Ich sage absichtlich Zuckergehalt, da über das Reduktionsvermögen der Harnpentose ja nichts bekannt ist.

mit Phloroglucin als Phloroglucid bestimmt.¹⁾ Es wurde nur 0,0638 Phloroglucid erhalten. Daraus berechnen sich ungefähr 0,037% Pentose. 200 ccm. desselben Harns lieferten nur äusserst wenig Osazon.

Diese Erscheinung erwies sich als ganz constant: in allen pentosehaltigen Harnen nahm die Quantität der Pentose beim Aufbewahren mit Chloroform mehr und mehr ab, bei jahrelangem Aufbewahren fast bis zum völligen Verschwinden, ohne dass der Harn sich äusserlich irgendwie änderte.

Schliesslich habe ich in diesem Harn noch die Quantität des neutralen Schwefels im Verhältniss zum Gesamtschwefel bestimmt in folgender Ueberlegung.

Kast und Mester²⁾ haben gefunden, dass bei langdauernder Chloroformnarkose die Quantität des neutralen Schwefels im Verhältniss zur Gesamtschwefelausscheidung erheblich ansteigt. Diese Beobachtung hat unabhängig von diesen Autoren Rudenko³⁾ in einer unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit hinsichtlich der Wirkung des Chloroformwassers gemacht, von welchem ich⁴⁾ schon früher nachgewiesen hatte, dass es, innerlich gegeben, Organeiweiss in vermehrtem Umfang zum Zerfall bringt. Ich kann die übrige hieran sich anknüpfende Litteratur übergehen, soviel scheint aber sicher zu sein, dass eine jede Steigerung des Zerfalls von Organeiweiss die Quantität des sogenannten neutralen Schwefels steigert. Wenn nun die Pentose von einem vermehrten Zerfall des Nucleoproteids des Pankreas abhängt, woran nach später zu erörternden Beobachtungen zu denken ist, so ist vielleicht zu erwarten, dass diese Abnormität des Stoffwechsels in einer erhöhten Ausscheidung des neutralen Schwefels zum Ausdruck kommt. Selbstverständlich würde man dabei annehmen müssen, dass mit diesem erhöhten Zerfall auch eine erhöhte Regeneration

1) Vergl. König, Untersuchung landwirthschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. 2. Aufl., S. 225.

2) Zeitschr. f. klin. Med., XVIII, S. 469.

3) Virchow's Arch., Bd. 128, S. 102.

4) Virchow's Arch., Bd. 115, S. 339.

einhergeht, sonst würde ja bald das gesammte Nucleoprotein des Pankreas zu Grunde gegangen sein.

50 ccm. Harn gaben 0,2058 BaSO₄ aus Gesamtschwefelsäure, das Filtrat + Waschwasser nach dem Eindampfen, Schmelzen mit Salpeter, 3maligem Abdampfen mit Salzsäure etc. 0,0262 BaSO₄ aus neutralem Schwefel. Daraus berechnet sich das Verhältniss von neutralem Schwefel zu oxydirtem = 1 : 7,85, oder der neutrale Schwefel beträgt 11,3% des Gesamtschwefels. Da die für dieses Verhältniss beim Menschen bisher gefundenen Zahlen zwischen 14 und 25,4% schwanken, so ist eine Steigerung des neutralen Schwefels sicher nicht vorhanden.

2. Fall S

Ich konnte den Harn an 2 Tagen beobachten. An dem einen Tag war er sehr concentrirt von 1027 spec. Gewicht, 1,61% N-Gehalt; von dem andern Tage ist hierüber nichts notirt. An beiden Tagen zeigte der Harn ausser dem Pentosegehalt keine Abnormität.

Aus 300 ccm. Harn wurde an einem Tag 1,051 g Osazon erhalten = 0,335%, am andern 0,615 g = 0,205%.

Zur Analyse¹⁾ wurden die Osazone vereinigt.

1. 0,1450 g gab 0,3301 CO₂ und 0,0800 H₂O,

2. 0,1420 „ „ 21.2 ccm. N bei 20° C. und 764 mm. Bar.

Daraus ergibt sich in Procenten:

	berechnet	gefunden
C	62,19	62,07
H	6,09	6,13
N	17,07	17,17

Die Reactionen einschliesslich der Orcinreaction waren positiv.

Das Befinden des betreffenden 65 Jahre alten Mannes war durchaus gut. Dr. Ferd. Blumenthal²⁾ hat diesen Fall wiederholt im Lauf von 6 Monaten untersucht und stets Pentose im Harn gefunden.

1) Diese Analyse, sowie alle folgenden Elementaranalysen, sind von dem chem. Assistenten des Instituts Herrn C. Neuberg ausgeführt, dem ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

2) Berl. klin. Wochenschr. 1895, Nr. 26.

3. Fall M

betrifft einen stets gesunden 36 Jahre alten Mann. Die Pentosurie¹⁾ wurde gelegentlich einer zum Zweck der Aufnahme in eine Lebensversicherung angestellten Harnuntersuchung entdeckt. Die Pentosurie ist theils von mir, theils von Ferd. Blumenthal vom Jahr 1895 ab, in welches die ersten Beobachtungen fallen, bis jetzt in unveränderter Stärke constatirt worden.

Die Analyse des über Schwefelsäure getrockneten Osazons aus dem Harn vom November 1895 ergab folgende Werthe:

1. 0,145 g gab 0,3318 CO₂ und 0,0825 H₂O,
2. 0,1400 „ „ 20, 8 ccm. N bei 14° C. und 754 mm. Bar.

Die Analyse eines Präparats aus dem Harn vom 2. XII. 1898 ergab

	0,143 g gab 0,3260 CO ₂ und 0,0787 H ₂ O		
	berechnet	gefunden	
		I	II
C	62,19	62,40	62,17
H	6,09	6,32	6,11
N	17,07	17,29	—

Bezüglich der einzelnen mir zugänglich gewesenen Harne führe ich Folgendes an.

1. Harn vom November 1895.

Von diesem Harn standen mir mehrere Portionen zur Verfügung, indessen keine genaue 24stündige Menge. Die verschiedenen Harne wurden vereinigt und mit Chloroform conservirt, nur die Osazonbestimmung wurde an einer frischen Harnportion gemacht.

500 ccm. lieferten 0,968 g Osazon = 0,193%. Den gesammten übrigen Harn habe ich in der Hoffnung, dass sich vielleicht im Lauf der Zeit neue Gesichtspunkte ergeben möchten, und in dem Wunsch, dann Material zur Verfügung zu haben, aufbewahrt. Leider ergab sich auch an diesem Harn, dass die Pentose bei mehr als 2jährigem Aufbewahren zum grössten Theil zersetzt war; es war nur noch sehr wenig Pentosazon

1) Ich verdanke den Harn der Güte des Herrn Dr. L. Feilchenfeld.

zu erhalten und das Destillat aus 200 ccm. Harn und 200 ccm. Salzsäure lieferten bei Fällung mit Phloroglucin nur 0,066 Phloroglucid.

Auch die sonstigen quantitativen Bestimmungen sind an diesem lange aufbewahrten Harn angestellt.

1. N-Gehalt 1,12 %.

2. Schwefelsäure und neutraler Schwefel. 50 ccm. lieferten 0,2586 BaSO₄ aus Gesamtschwefelsäure, im Filtrat 0,0192 BaSO₄ aus neutralem Schwefel. Somit war das Verhältniss von neutralem Schwefel zum oxydirt = 1 : 13,5 oder der neutrale Schwefel betrug noch nicht ganz 7 % des Gesamtschwefels, ein ganz auffallend niedriger Werth.

Das Verhältniss vom Gesamtschwefel zum Stickstoff ergibt sich = 1 : 14,7.

3. Harnsäurebestimmung, wie gewöhnlich in 200 ccm. ausgeführt, ergab nur 0,017 % Harnsäure; augenscheinlich wird die Harnsäure bei dem langen Aufbewahren zersetzt, worauf ich gelegentlich schon aufmerksam gemacht habe.

4. Zur Bestimmung der Alloxurbasen nach dem von mir beschriebenen Verfahren¹⁾ wurden 600 ccm. Harn mit 200 Magnesiamischung gemischt = 800 ccm., vom Filtrat wurden 700 ccm. zur Bestimmung verwendet. Der Silberniederschlag erfordert für die angewendeten 600 ccm. 12,1 Rhodanammonlösung, von welcher 1 ccm. = 1,7825 Alloxurbasen. 1 Liter des Harns enthält also 35,95 mg Alloxurbasen, was als ein mittlerer Gehalt zu bezeichnen ist.

2. Harn vom 4. October 1898.

Spec. Gewicht 1021. Kein Eiweiss, normales Verhalten. Aus 200 ccm. wurde durch Destillation mit Salzsäure etc. 0,2232 g Phloroglucid erhalten. Hieraus berechnet sich 0,1213 g Furfurol und hieraus 0,2285 g = 0,114 % Pentose, ein auffallend niedriger Gehalt gegenüber der starken Reactionen auf Pentose, welche der Harn gab.

¹⁾ Pflüger's Arch., Bd. 69, S. 268.

3. Harn vom 2. December 1898.

Spec. Gewicht 1024. Verhalten normal.

1. 200 ccm. gaben etwas über 0,5 g Osazon = 0,25 %.

2. 200 ccm. lieferten 0,2964 Phloroglucid = 0,1565 Furfurol = 0,3033 g Pentose = 0,1516 %.

Der Harn gab ausgezeichnete Reactionen.

IV. Beobachtungen über Pentosurie in der Litteratur.

Bestätigungen meiner Angaben über das Vorkommen von Pentose im Harn liegen nur in sehr geringer Zahl vor. E. Reale¹⁾ hat 1894 einen Fall beschrieben, welcher mit dem ersten von Jastrowitz und mir beobachteten insofern Aehnlichkeit zu haben scheint, als auch dieser Patient eine Entziehungscur wegen Morphiumpmissbrauchs durchmachte, allein er ist doch von dem meinigen durchaus verschieden, da bei Verminderung resp. Sistirung des Morphiumgebrauchs die Reactionen im Harn schon nach 4 Tagen verschwanden. Der Befund scheint durch den Schmelzpunkt des Osazons annähernd gesichert.

Ein zweiter Fall ist von Colombini²⁾ beschrieben. Er betrifft einen mit einer Hautkrankheit behafteten Mann. Aus dem Referat (das Original war mir nicht zugänglich) ist nicht zu ersehen, ob mit der Heilung der Hautkrankheit auch die Pentose aus dem Harn verschwand.

Ungleich wichtiger als diese Beobachtungen sind die von E. Külz und Vogel³⁾ an Diabetikern und Hunden mit experimentellem Diabetes gemachten. Es gelang ihnen, in 10 Fällen von schwerem Diabetes ausnahmslos neben dem Traubenzucker Pentose nachzuweisen, allerdings nur durch eine sehr mühselige Behandlung der in grossen Mengen aus dem Harn dargestellten Osazone mit warmem Wasser. Sie konnten ausserdem bei hungernden Hunden nach Exstirpation des Pankreas (2 Fälle) und bei einem Hunde mit Phloridzindiabetes im Harn

1) Centralbl. f. inn. Med. 1894, S. 680. Maly's Jahresber. f. Thierchem. f. 1894, S. 627. Das Original in Rivist. clin. e therapeutica 1894 Nr. 3 war mir nicht zugänglich.

2) Maly's Jahresber. f. 1897, S. 733.

3) Zeitschr. f. Biolog., Bd. 32, S. 185.

Pentose neben Traubenzucker nachweisen. Nach diesen ausgezeichneten Beobachtungen kann man wohl bestimmt annehmen, dass jeder schwere Fall von Diabetes von einer Ausscheidung von Pentose begleitet ist, eine gelinde Pentosurie darstellt, eine Thatsache, die für die Deutung der Pentosurie von grosser Bedeutung ist.

V. Ueber die Abstammung der Pentose im Harn.

Wenn es auch als sicher festgestellt anzusehen ist, dass unsere Nahrung häufig Pentosen enthält und diese zum Theil durch den Harn unverändert ausgeschieden werden können, so steht es andererseits ausser Zweifel, dass diese Abstammung für die von mir beobachteten Fälle nicht in Betracht kommt. Es ist durchaus nicht abzusehen, wie es zugehen sollte, dass bestimmte Individuen dauernd, abweichend von allen anderen, eine pentosenreiche Nahrung zu sich führen sollten. Ausserdem ist der erste Fall im Krankenhause beobachtet worden bei einer Diät, welche in keiner Weise von der gewöhnlichen abwich. Es kann nicht zweifelhaft sein, dass die Quelle der Pentose in diesen Fällen im Organismus selbst zu suchen ist, und wenn noch ein Zweifel bestände, so wird er durch die oben erwähnten von E. Külz und Vogel angestellten Beobachtungen an hungernden Hunden vollends gehoben.

Nachdem nun A. Kossel¹⁾ aus der Hefenucleinsäure u. A. ein Kohlenhydrat erhalten hatte, welches mit Säuren reichlich Furfurol lieferte, also ohne Zweifel zu den Pentosen zu rechnen ist, und Hammarsten²⁾ aus dem Nucleoproteid des Pankreas ein Osazon bekommen hatte, welches mit grösster Wahrscheinlichkeit als Pentosazon anzusehen war, wenn sich Hammarsten selbst auch mit einiger Reserve darüber äusserte, lag es sehr nahe, als Quelle der Pentose im Harn das Nucleoproteid des Pankreas zu vermuthen. Diese Vermuthung gewinnt an Wahrscheinlichkeit, wenn es gelingt, die Identität der Harnpentose mit der Pankreaspentose zu erweisen.

Da Hammarsten das Osazon nur in äusserst geringer,

1) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1893, S. 157 u. 380.

2) Diese Zeitschr., Bd. XIX, S. 28.

zur Analyse nicht ausreichender Quantität erhalten hatte, so habe ich mich zunächst bemüht, grössere Mengen des Pankreasosazons darzustellen. Dieses gelang mir, indem ich nicht von dem Nucleoproteid, sondern von dem Pankreas selbst ausging und das Verfahren unter Vernachlässigung aller sonst entstehenden Produkte nur auf die Darstellung des Osazons richtete. Dieses Verfahren habe ich in der Berliner klinischen Wochenschrift 1895 Nr. 17 beschrieben. Ich konnte das erhaltene Osazon durch eine N-Bestimmung identificiren und zugleich feststellen, dass die Löslichkeitsverhältnisse des Pentosazons aus Harn und Pankreas in Wasser genau dieselben waren. 250 ccm. der kaltgesättigten (bei 15,5° C.) wässerigen Lösung des Osazons aus Harn enthielten 0,0094 g gelöst, 250 ccm. derselben Lösung von Pankreas-Osazon 0,0095 g. Der äussere Habitus beider Verbindungen ist vollkommen derselbe.

Ich habe mich nun zunächst bemüht, die Darstellung zu verbessern, um eine grössere Ausbeute zu erhalten, und bin nach verschiedenen Versuchen bei folgendem Verfahren stehen geblieben.

Ca. 2 Kilo von sichtbarem Fett befreites Rinderpankreas (entsprechend 5—6 Drüsen) werden fein zerhackt mit 6 Liter Wasser zum Sieden erhitzt, kurze Zeit im Sieden erhalten, dann zur vollständigen Abscheidung des Fettes bis zum nächsten Tage kalt gestellt und filtrirt. Das Filtrat wird bis zum dünnen Syrup eingedampft, dann zur Abscheidung des Tyrosins einige Tage stehen gelassen und ohne vorgängige Filtration mit ca. 800 ccm. Alkohol von 90—93 Vol.-Proc. gefällt, am nächsten Tage filtrirt. Die alkoholischen Auszüge enthalten so wenig Nucleoproteid bezw. liefern so wenig Pentosazon, dass man sie nicht zu berücksichtigen braucht; beim Abdampfen gaben sie reichlich Leucin. Das vom Alkohol nicht Gelöste wird mit kaltem Wasser angerührt und durch Leinwand colirt. Auf der Leinwand bleibt das Tyrosin. Die colirten Auszüge wurden filtrirt.¹⁾ Die Filtration erfolgt langsam, es ist daher zweck-

¹⁾ Der auf dem Filter bleibende Rückstand besteht meistens aus phosphorsaurem Kalk. In 2 Fällen jedoch war er grösstentheils organischer

mässig, die Flüssigkeit vorher anzuwärmen. Das Filtrat wird durch Wasserzusatz auf 400 ccm. gebracht, 100 ccm. Salzsäure von 1,12 D zugesetzt, die Mischung in einem Kolben 3 1/2 Stunden im kochenden Wasserbad erhitzt, nach einigem Abkühlen Natronlauge zugesetzt, bis die Reaction nur noch schwach sauer. Dabei scheidet sich ein reichlicher schwarzer N- und S-haltiger Niederschlag ab, welcher offenbar Schmiedeberg's Melanoidinsäure¹⁾ entspricht. Es ist bemerkenswerth, dass also nicht allein die eigentlichen Eiweisskörper, sondern auch Nucleoproteide diesen Farbstoff liefern. Man filtrirt von diesem ab, neutralisirt völlig mit Natronlauge, säuert dann mit Essigsäure an und lässt bis zum nächsten Tage stehen. Dabei scheidet sich, den Angaben Hammarsten's entsprechend, das aus der Zersetzung des Nucleoproteids stammende Guanin ab. Das Filtrat hiervon, dessen Volumen 500–600 ccm. beträgt, wird mit 15 g Phenylhydrazin, in der entsprechenden Menge Essigsäure gelöst, versetzt und 1 1/2 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt, mit Hülfe eines Heisswassertrichtes heiss filtrirt. Beim Abkühlen scheidet sich das Phenylpentosazon aus; man filtrirt, sobald die Flüssigkeit einigermaßen erkaltet ist — die Abkühlung kann durch Einsetzen des Becherglases in kaltes Wasser befördert werden —, nicht erst am nächsten Tage, da sich bei längerem Stehenlassen harzige Substanzen ausscheiden. Das so erhaltene Phenylpentosazon ist schon ziemlich rein. Die Ausbeute beträgt etwa 3 g. Zur Reinigung wird das Pentosazon aus heissem Wasser allein oder unter Zusatz von etwas Alkohol mehrmals umkrystallisirt. Sehr zweckmässig ist es, das trockene Präparat schliesslich noch einmal mit Aether zu behandeln.

Natur, löste sich in heissem Wasser und fiel beim Erkalten wieder aus. Ansäuern mit Essigsäure bewirkte in der etwas abgekühlten Lösung einen pulverigen weissen Niederschlag, welcher sich nur schwierig oder garnicht abfiltriren liess. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelte es sich um die von Bang (diese Zeitschr. Bd. XXVI, S. 133) beschriebene Guanylsäure bezw. das Natriumsalz derselben. Man muss annehmen, dass beim Kochen etwas Nucleoprotein zersetzt, Guanylsäure gebildet ist, oder auch schon Guanylsäure im Pankreas vorhanden war.

1) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XXXIX, S. 65.

Der äussere Habitus des Pankreaspentosazons stimmt mit dem des Harnosazons vollkommen überein, sein Schmelzpunkt liegt wie bei diesem zwischen 159 und 160°. Als bemerkenswerthe äussere Erscheinungsform möchte ich noch das Verhalten kleiner Mengen beim Lösen in heissem Wasser im Reagensglas notiren; aus solchen Lösungen scheidet es sich bei schnellerem Abkühlen gradezu in Form eines hellgelben Gerinnsels ab.

Die Analyse der über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab folgende Werthe:

1. 0,1420 g gab 0,3270 CO₂ und 0,0832 H₂O.
2. 0,1510 g gab 22,5 ccm. N bei 14° und 761 mm. Bar.

Ein Theil der analysirten Substanz nochmals umkrystallisirt ergab:

1. 0,1498 g gab 0,3420 CO₂ und 0,0827 H₂O.
2. 0,1355 g gab 20,2 ccm. N bei 17° und 755 mm. Bar.

Bei einer früheren Analyse (I) hatten 0,1762 g 20,7 ccm. N bei 15° und 756 mm. Barometerstand gegeben.

Daraus berechnet sich

	Gefunden		Berechnet für C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₅
I	II	III	
C —	62,23	62,26	62,19
H —	6,12	6,13	6,09
N 17,65	17,59	17,19	17,07

Die Zahlen lassen keinen Zweifel daran, dass der analysirte Körper Phenylpentosazon ist. Ein weiterer Beweis, wenn es eines solchen noch bedürfte, liegt darin, dass sowohl das Nucleoprotein selbst, als auch die wässerigen Auszüge des Pankreas die Tollens'sche Phloroglucin- und Orcinreactionen gaben.

Um noch weitere Anhaltspunkte ausser den bereits angeführten zur Beurtheilung der etwaigen Identität des Harnpentosazons und Pankreaspentosazons zu gewinnen, versuchte ich die Circularpolarisation derselben zu bestimmen. Dies erwies sich beim Harnpentosazon selbst in einer nur 0,4%igen alkoholischen Lösung der zu dunklen Färbung wegen unmöglich. Die Lösung des Pankreaspentosazons gestattete in einer 0,4%igen

Lösung zur Noth eine Ablesung in einem für Traubenzucker graduirten Halbschattenapparat bei Auerlicht; sie schien optisch inactiv zu sein. Bei 1%iger und 4%iger Lösung war die Ablesung unmöglich. Auf den Farbenunterschied der Lösung der beiden Osazone ist zwar kein besonderer Werth zu legen, er verdient jedoch immerhin notirt zu werden, da zur Herstellung der Lösungen in beiden Fällen Antheile von analysirten Präparaten gedient hatten.

Wenn wir uns nun auf den Standpunkt stellen, dass die Osazone mit Harn und Pankreas identisch sind, was ich nicht für voll erwiesen ansehe, so folgt daraus natürlich noch nicht, dass die Harnpentose wirklich aus dem Pankreas stammt, es lassen sich im Gegentheil erhebliche Bedenken gegen diese Anschauung geltend machen.

Das Hauptbedenken ist, dass nach den Untersuchungen von Külz und Vogel gerade bei den des Pankreas beraubten Thieren neben Traubenzucker Pentose im Harn auftritt. Hier haben wir also schon Pentose ohne Betheiligung des Pankreas. Nun könnte man ja daran denken, dass auch in anderen Organen soviel Pentose lieferndes Nucleoproteid steckt, dass das Pankreas-nucleoproteid als Muttersubstanz der Pentose auch entbehrt werden kann. Das ist aber nach den Untersuchungen von Ferd. Blumenthal¹⁾ wenig wahrscheinlich. Derselbe fand ausser im Pankreas noch in der Thymus, Thyreoidea, Gehirn, Milz, Muskeln, Leber Pentose liefernde Nucleoproteide, allein die Quantität der Pentose war, abgesehen von der Thymus, gering, und diese kommt für das erwachsene Individuum nicht in Betracht.

Die Annahme der Abstammung der Pentose aus dem Pankreas findet zudem in Thierversuchen keine Stütze.

Ein kleiner Hund erhielt an 5 aufeinander folgenden Tagen 1 ³/₄ Kilo gekochtes Pankreas sammt der beim Kochen erhaltenen Brühe als einzige Nahrung. Er schied dabei 40,7 g Stickstoff im Harn aus. Das Pankreas war also ohne Zweifel verdaut und resorbirt. Dass das Nucleoproteid selbst im Organismus

1) Zeitschr. f. klin. Med., Bd. XXXIV, Heft 1 u. 2.

zersetzt war, ergab sich daraus, dass der Hund mehr als 3 g Allantoin ausschied, dennoch war der Harn frei von Pentose. Ein zweiter Versuch an demselben Hund mit 2 Kilo Pankreas gleichfalls in 5 Tagen hatte bezüglich der Pentose dasselbe negative Resultat. Ich will durchaus nicht behaupten, dass nach dem Ausfall dieser Versuche die Abstammung der Harnpentose aus dem Pankreasnucleoproteid ausgeschlossen ist, jedenfalls aber ist aus denselben nichts zu Gunsten dieser Annahme zu entnehmen.

Man muss also doch an eine andere Art der Abstammung denken, nämlich an die aus Hexosen. Der Uebergang von den Hexosen zu den Pentosen vollzieht sich, wie Otto Ruff¹⁾ kürzlich gefunden hat, auf sehr einfachem Wege durch die Gluconsäure hindurch. Es gelang ihm, aus dieser, dem ersten Oxydationsprodukt der Dextrose, durch Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von basischem Ferriacetat d-Arabinose in grosser Menge darzustellen. Möglicherweise kommt dieser Vorgang auch für den Organismus des «Pentosurikers» in Betracht. Man könnte sich vorstellen, dass bei diesem der Zucker eine abnorme Oxydation zu Gluconsäure erfährt, aus welcher dann Pentose hervorgehen könnte, oder dass auch normaler Weise Gluconsäure als intermediäres Produkt entsteht, diese aber ganz oxydirt wird, während bei dem Pentosuriker die Oxydation nur bis zur Pentose geht. Die betreffenden mit Pentosurie behafteten Individuen sind der Experimentation leider unzugänglich, vielleicht ist es aber möglich, durch Thierversuche, welche ich in Angriff genommen habe, zur Klärung der Abstammung der Pentose in dieser Richtung beizutragen.²⁾

1) Ber. d. d. chem. G. XXXI, S. 1573 und XXXII. S. 550.

2) Anm. bei der Correctur. Der Harn eines Kaninchens, welches an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jedesmal ca. 7 Gramm Gluconsäure als Na-salz erhalten hatte, enthielt keine Pentose. Da er stark alkalisch reagierte und wenig Oxalsäure enthielt, war die Gluconsäure wohl vollständig oxydirt.

Ueber das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen.

Von

Wl. Gulewitsch.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1899.)

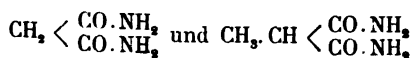
I. Mittheilung.

Durch zahlreiche und mühevollen Untersuchungen ist die Thatsache festgestellt, dass bei der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe das grosse und äusserst complicirt zusammengesetzte Molekül derselben schliesslich in eine Menge von verschiedenen, einfacher gebauten Verbindungen zerfällt. Wie aber dieser Zerfall vor sich geht, welche chemische Bindungen im Eiweissmolekül durch die Wirkung des Trypsins angegriffen und gelöst werden, ob dabei nicht etwa neue Bindungen erscheinen und neue Moleküle aus den entstandenen Bruchtheilen gebildet werden, kurz gesagt, was für ein Mechanismus der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe zu Grunde liegt, darüber gibt die biologische Chemie bis jetzt keine Antwort.

Die Kenntniss des Mechanismus der tryptischen Verdauung wird nicht nur den stufenweisen Zerfall des Eiweissmoleküls verständlich machen; sie wird auch den Schlüssel zur Aufklärung der chemischen Constitution der Eiweissstoffe und somit einen bedeutenden Beitrag zur Lösung eines der theoretisch interessantesten und praktisch wichtigsten Probleme: des der Eiweiss-synthese, liefern.

Aus denselben Gründen, nach welchen man für die Polysaccharide die Möglichkeit der Vereinigung von Resten ein-

facher gebauter Kohlehydratgruppen zu complicirten Molekülen durch direkte Kohlenstoffbindungen ausschliesst und die Bindung derselben durch die Sauerstoffatome annimmt, ist auch für die Eiweissstoffe die Vermuthung wenig plausibel, dass die durch Trypsineinwirkung so leicht zu lösenden Bindungen direkte Vereinigungen der Kohlenstoffatome untereinander seien. Damit ist aber bei weitem noch nicht gesagt, dass die einzelnen Gruppen im Eiweissmolekül durch Sauerstoffatome verbunden sind, da für die Eiweissstoffe noch die Möglichkeit vorhanden ist, dass die einzelnen Theile des Moleküls derselben durch die verschiedenen stickstoffhaltigen Gruppen im Zusammenhang stehen. Durch die bekannten Untersuchungen von Schützenberger ist sogar die Annahme plausibel gemacht, dass wenigstens ein Theil der im Eiweissmolekül vorhandenen Bindungen von dieser letzteren Art ist. Die meines Wissens zuerst von Morochowetz¹⁾ erwähnte Thatsache, dass bei der tryptischen Verdauung die Biuretreaction schliesslich verschwindet, lässt noch keinen Schluss über die durch Trypsin anzugreifenden Bindungen des Eiweissmoleküls zu, da über die die Biuretreaction bedingenden Gruppen des Eiweissmoleküls noch nichts bekannt ist, und durch die Untersuchungen von H. Schiff²⁾ bewiesen ist, dass auch diejenigen Körper, in welchen die stickstoffhaltigen Bindungen fehlen, diese Reaction geben können, wie z. B. folgende Substanzen:



Es ist selbstverständlich auch die Möglichkeit denkbar, dass die verschiedenen im Eiweissmolekül vorhandenen Reste von einfacheren Molekülen durch die verschiedenartigen Bindungen zu einer grossen Einheit vereinigt sind.

Die Untersuchung des Mechanismus der tryptischen Eiweissverdauung durch das Studium des Abbauprocesses der Eiweissstoffe unter der Einwirkung von Trypsin scheint zur Zeit nur wenig Erfolg zu versprechen, vor Allem in Folge der

¹⁾ L. Morochowetz, Petersburger medic. Wochenschr., N. F., 3. Jahrg. 1886, S. 135.

²⁾ H. Schiff, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 29, S. 298.

äusserst complicirten und verwickelten Verhältnisse, die dabei vermuthlich stattfinden. Mehr Erfolg kann man vielleicht durch Versuche über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen erzielen, indem man von diesen nach und nach zu den complicirteren aufsteigt. Es müssen doch irgend welche Körper vorhanden sein, die den Eiweissstoffen ähnlich durch das Trypsin zerspalten werden! Es wäre ganz sonderbar, wenn nur die Eiweisskörper durch das Trypsin angreifbar wären, um so mehr, als auch die Eiweisskörper selbst ohne Zweifel eine verschieden complicirte Zusammensetzung haben.

Dass die Versuche in dieser Richtung nicht erfolglos bleiben werden, zeigt die Arbeit von A. Kossel und A. Mathews,¹⁾ welche gefunden haben, dass Protamine, die im Vergleich mit Eiweissstoffen viel einfacher zusammengesetzt sind, durch das Trypsin unter Bildung von Hexonbasen und unter Verschwinden der Biuretreaction zerspalten werden.

Andere Versuche die Einwirkung des Trypsins auf einfachere Substanzen betreffend fehlen bis jetzt meines Wissens vollständig. Die zahlreichen Beobachtungen über das Schicksal der per os gegebenen Substanzen im Organismus können hier nicht in Betracht kommen, auch in den Fällen nicht, wo ihr Resultat negativ war, da unveränderter Durchgang der eingeführten Substanzen durch den Organismus nur dadurch bedingt sein kann, dass sie im Magen resp. im Darm resorbirt werden, bevor sie der Wirkung des Trypsins in genügendem Maasse unterlegen sind; auch können die Zerspaltungsprodukte durch synthetische Vorgänge im Organismus in die ursprünglichen Verbindungen zurückverwandelt sein.

Nach dem Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel, dem ich für die Ueberlassung dieses interessanten Themas zu vielem Dank verpflichtet bin, habe ich einige Versuche über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere Verbindungen ausgeführt. Zwar habe ich bis jetzt fast nur negative Resultate erhalten, doch seien auch diese mitgetheilt, da auch die negativen Resultate von Wichtigkeit sind, indem sie den Kreis der Tryp-

1) A. Kossel und A. Mathews, diese Zeitschr., Bd. 25, S. 190.

sinwirkung einschränken und somit per exclusionem zu der Aufsuchung der von Trypsin angreifbaren Substanzen führen können. Selbstverständlich ist es nicht leicht, die zu solchen Versuchen passenden Substanzen ausfindig zu machen, da die Angreifbarkeit derselben durch das Trypsin nicht nur von einer besonderen Constitution, sondern auch von einer bestimmten Configuration abhängig sein kann, wie es die höchst interessanten Versuche von E. Fischer¹⁾ über die Einwirkung von Enzymen auf verschiedene Stereoisomere zeigen. Darum kann die Lösung der Aufgabe nur nach einer grossen Zahl negativer Versuche erzielt werden.

Ein weiterer praktisch sehr ungünstiger Umstand ist der, dass in der Pankreasdrüse nicht Trypsin allein, sondern noch ein diastatisches und ein fettzerspaltendes Ferment vorhanden sind. Um die Einwirkung dieser beiden letzteren Enzyme zu eliminieren, müssen sie zuerst zerstört werden, was durch die Selbstverdauung des Pankreasextracts resp. durch andere Operationen ohne Mühe zu erzielen ist, zugleich aber die Abschwächung des Trypsins selbst herbeiführen kann.

Eine andere Complication kann auch darin bestehen, dass bis jetzt noch nicht nachgewiesen ist, dass das Trypsin aus einem einzigen Fermente und nicht aus einem Gemenge von mehreren Enzymen besteht, die in ihrer Einwirkung etwas differiren, so dass derselbe Körper durch ein Präparat des Trypsins zerspalten werden, durch ein anderes unangegriffen bleiben kann. Existiren doch verschiedene Enzyme, die die Spaltung der Kohlehydrate in bestimmten Richtungen ausführen und den einen Körper dieser Gruppe zerspalten, während sie den anderen intact lassen.

Für meine Versuche habe ich verschiedenartige Präparate des Trypsins benutzt.

So habe ich z. B. eine tryptisch wirkende Flüssigkeit nach Hammarsten's²⁾ Verfahren dargestellt, indem ich fein zerhacktes

1) E. Fischer, diese Zeitschr., Bd. 26, S. 60.

2) O. Hammarsten. Lehrbuch der physiol. Chem., 3. Aufl. 1895, S. 265.

Pankreas mit 8—10 Theilen Wasser, welches 0,03% Ammoniak enthielt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur digerirte, dann abfiltrirte und das Filtrat mit verdünnter Essigsäure vorsichtig fällte; der entstandene Niederschlag wurde möglichst schnell abfiltrirt, mit verdünnter Sodalösung digerirt und nach einiger Zeit abfiltrirt. Das Volumen der Flüssigkeit betrug $\frac{3}{4}$ der ersten Lösung, der Gehalt an Soda war 0,25—0,3%. Diese tryptisch wirkende Flüssigkeit will ich als Tr. A. bezeichnen.

Eine andere tryptisch wirkende Flüssigkeit habe ich nach folgendem Verfahren dargestellt: 17 Pankreasdrüsen wurden mit etwas Thymol und Chloroform¹⁾ versetzt und 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur liegen lassen. Dann wurde jedes Pankreas getrennt fein zerhackt und während 20 Stunden mit 4 Gewichtstheilen einer wässerigen Lösung digerirt, die in 1 L. 1 gr. wasserfreies Natriumcarbonat, 1 gr. Thymol und 5 ccm. Chloroform enthielt. Von jeder Portion wurde je eine kleine Probe zur Prüfung mit Fibrin auf ihre tryptische Wirkung entnommen; von 17 Pankreasdrüsen wurde eine kräftige Wirkung bei nur 7 constatirt und diese für die weitere Verarbeitung benutzt. 3 Portionen wurden filtrirt und mit Soda bis 0,5% Gehalt gemischt, dann im Brütöfen 48 Stunden digerirt (Tr. B.). Die anderen 4 Portionen wurden auf dieselbe Weise 4 \times 24 Stunden digerirt, filtrirt und in Pergamentschläuchen 8 \times 24 Stunden im fließenden Wasser unter Zusatz von Thymol dialysirt, dann mit 0,3% Soda versetzt und filtrirt (Tr. C.).

Für die meisten Versuche habe ich das von Dr. Grübler-Dresden bezogene Präparat: «Trypsinum siccum Grübler» angewandt (Tr. D.).

Die Verdauungskraft der verschiedenen von mir benutzten Präparate war sehr ungleich, wie es bei den Trypsinpräparaten leider so oft beobachtet wird. Als Verdauungsprobe dienten

1) Bei allen meinen Versuchen habe ich besonderes Gewicht darauf gelegt, dass dem Trypsin die bakteriellen Fermente nicht beigemischt waren; darum sind alle Operationen antiseptisch unter Anwendung von Thymol und Chloroform durchgeführt.

2 gr. zwischen Filtrirpapier abgepresstes Fibrin,¹⁾ das mit Alkohol in keiner Berührung war; das zerkleinerte Fibrin wurde mit 10 ccm. 0,6%iger Sodalösung gemischt, dazu 10 ccm. der zu prüfenden Flüssigkeit zugesetzt, und das Reagensglas mit der Mischung in das Wasserbad bei 38—41° gebracht. Tr. A. löste das Fibrin bei diesen Bedingungen nur langsam, nämlich in 1 1/4 Stunde.²⁾ Durch Tr. B. vor seinem Digeriren im Brütöfen wurde das Fibrin in 35—40 Minuten, durch Tr. C. vor Digeriren in 25—30 Minuten aufgelöst; nach dem Digeriren und nach dem Dialysiren (bei Tr. C.) nahm aber die Verdauungskraft beider Präparate auffallend ab. Tr. D., von welchem ich zwei Präparate hatte, verdaute kräftig; 0,1 gr.³⁾ in 15 ccm. 0,5%iger Sodalösung gelöst, brachten 2 gr. Fibrin in 17 bis 20 Minuten zur Lösung, dass das Fibrin vor den Augen so zu sagen schmolz. Auch dieses kräftig wirkende Präparat war gegen die Digerirung bei Brüttemperatur sehr empfindlich; einige in dieser Richtung gemachten Versuche haben gezeigt, dass die Trypsinlösung, je länger sie vorher, d. h. ohne Fibrin, erwärmt wurde, desto mehr in ihrer Wirkung abgeschwächt war. Nach Erwärmen in der sodahaltigen Lösung im Brütöfen während 19 Stunden konnte Tr. D. bei ganz denselben Bedingungen wie früher das zugesetzte Fibrin erst in 22 Stunden auflösen; das der Wirkung der Brüttemperatur während 1 1/4 Stunde ausgesetzte Tr. D. löste das Fibrin in 3 1/2 Stunden u. s. w., und sogar die vorher nur 1/4 Stunde bei Brüttemperatur erwärmte Lösung des Tr. D. vermag das Fibrin erst in 70 Minuten lösen. Ich will diese Thatsache an dieser Stelle nur notiren, ohne

1) Durch einige Kontrollproben mit gekochten Trypsinlösungen wurde bewiesen, dass dieses Fibrin bei Brüttemperatur ohne Mitwirkung des Trypsins nicht gelöst wird.

2) Damit will ich keineswegs sagen, dass die Hammarsten'sche Methode schlechte Resultate gibt: wie es aus der Beschreibung der Darstellung von Tr. B. und Tr. C. zu sehen ist, sind die kräftig wirkenden Pankreasdrüsen nicht so leicht zu erhalten, und es ist wohl möglich, dass die für die Darstellung von Tr. A. genommenen Pankreasdrüsen schon an sich schwach wirkend waren.

3) In diesen 0,1 gr. war wohl nur eine ganz geringe Menge von Trypsin selbst vorhanden.

derselben eine Erklärung oder eine Verallgemeinerung zu geben. Es ist zu bemerken, dass die Trypsinlösungen auch am Ende der weiter unten beschriebenen Versuche ihre Verdauungskraft nicht vollständig verloren haben und die zugesetzten Fibrinflocken allerdings sehr langsam verdauten.

Alle Trypsinpräparate waren frei von dem fettzerspaltenden Fermente, wie es durch die Proben mit Olivenöl und mit Salol nachgewiesen wurde. Diastatisches Ferment war in einer Lösung von Tr. A. vorhanden, in einer anderen abwesend; Tr. B., Tr. C. und ein Präparat von Tr. D. enthielten ebenfalls keine Spuren von diastatischem Fermente; die diastatische Wirkung von einem anderen Präparate des Tr. D. war kaum bemerkbar; nach 15stündigem Digeriren im Brütoven mit Stärkekleister wurden nur Spuren von reducirendem Zucker gefunden.

Die chemischen Präparate, die ich als Versuchsobjecte benutzt habe, habe ich theils von Kahlbaum resp. aus einer Apotheke bezogen, theils selbst dargestellt.

Die Versuche wurden so angestellt, dass etwa 0,1—0,5 gr. Substanz mit 20 ccm. der Trypsinlösungen A und C resp. mit 0,13 gr. des in 20 ccm. 0,5%iger Sodalösung gelösten Tr. D. gemischt und dazu 0,02 gr. gepulvertes Thymol resp. 3 Tropfen Chloroform¹⁾ zugesetzt wurden. Um zu wissen, ob die Substanz sich nicht etwa schon beim Digeriren mit Soda allein zersetzt, wurden jedesmal auch die Kontrollversuche ausgeführt, indem unter den gleichen Bedingungen wie im Hauptversuch gekochte Trypsinlösung angewandt wurde. Die Mischungen wurden im Brütoven in Reagenzgläsern, resp. in Kölbchen²⁾ bei 38—41° digerirt. Die Versuchsdauer betrug 5—17 Tage, nur je 2 Versuche mit Phenetol und Aethylanilin und 1 Versuch mit Hippursäure, sowie 2 Versuche mit Salol dauerten 35—65 Stunden; jede Substanz, ausser Salol, wurde wenigstens in je einem Versuche

1) Chloroform wurde in den Versuchen zugesetzt, wo das Vorkommen des Phenols in der Flüssigkeit zu entdecken war.

2) Die schwer löslichen Körper wurden in Kölbchen digerirt, um eine möglichst grosse Berührungsfläche zwischen der Substanz und der Trypsinlösung zu erzielen.

auch etwa 1 Monat lang digerirt; die Versuche mit Biuret wurden erst nach $2\frac{1}{2}$ —3 Monaten abgebrochen.

Die Entscheidung der Frage, ob die betreffende Substanz durch das Trypsin zersetzt wurde oder nicht, sollte in meinen Versuchen gewöhnlich durch Aufsuchen der Zersetzungsprodukte gegeben werden. Von diesen Zersetzungsprodukten kommen hier am meisten in Betracht Anilin, Phenol und Essigsäure.

Das eventuell sogar in Spuren vorhandene Anilin konnte leicht durch die äusserst empfindliche Chlorkalkreaction entdeckt werden. Zu dem Zwecke versetzte ich die zu prüfende, im Allgemeinen durch das Abdestilliren der Versuchslösung erhaltene Flüssigkeit (2—3 Fractionen von je 2—5 ccm.) mit einigen Tropfen der filtrirten Mischung von Chlorkalk mit Wasser (1:20). Bei Anwesenheit von Anilin entsteht dabei eine sehr intensive röthlich-violette Färbung; ein Ueberschuss des Reagens ist insofern schädlich, als dabei, besonders bei Gegenwart von sehr geringer Menge des Anilins, die Färbung sehr bald in eine braune übergeht oder sogar verschwindet. 20 ccm. der Lösung von Tr. A. mit 0,009 gr. Anilin versetzt, gaben eine ganz deutliche Reaction, sowohl unmittelbar, wie auch im Destillate. Bei der Gegenwart von Phenol oder Thymol nimmt die Reaction eine mehr blaue Nuance an und kann sogar eine rein blaue Färbung geben. Das mit Aethylanilin geschüttelte und filtrirte Wasser liefert mit einem Ueberschuss von Chlorkalk eine grau-blaue Färbung; wenn man aber die filtrirte Lösung nur mit wenigen Tropfen von Chlorkalk versetzt, dann ist die Gegenwart von Aethylanilin nicht störend, da es die Färbung nur nach längerem Stehen, Anilin aber sofort oder nach einigen Secunden gibt.

Zur Auffindung des Phenols (in den meisten Fällen im Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit) war die Reaction mit Bromwasser direkt nicht anwendbar, da die Körper, welche bei ihrer Spaltung Phenol liefern sollten, dieselbe oder die ähnliche Reaction geben, wohl aber konnte man diese Reaction benutzen, wenn man die dabei erhaltene äusserst schwache Trübung mit der im Kontrollversuche zu beobachtenden verglich. Auch die Reaction mit Chlorkalk und

Ammoniak wurde häufig angewandt; nach meinen Versuchen lässt sie bei vorsichtiger Ausführung noch 1 : 10000 Phenol deutlich erkennen.

Die Menge der abgespaltenen Essigsäure wurde quantitativ bestimmt, indem die Flüssigkeit mit 0,5 gr. Weinsäure und 280 ccm. Wasser versetzt, 200 ccm. davon abdestillirt und mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge titirt wurden. Dabei wurde auch berücksichtigt, dass die für den Versuch genommene Substanz beim Digeriren mit Sodalösung allein die Essigsäure theilweise abspalten kann, und dass beim Digeriren der Trypsinlösung selbst flüchtige Säuren entstehen und darin von vornherein als Salze enthalten sein können. Darum wurde jedesmal: 1. die Menge der flüchtigen Säuren bestimmt, welche in der Flüssigkeit nach Digeriren der Substanz mit der ungekochten (S) und 2. mit der gekochten (A) Trypsinlösung enthalten ist; aus einigen Versuchen mit Trypsinlösungen allein wurde die Menge der in der Trypsinlösung präformirt (B) enthaltenen und der darin während des Digerirens (C) gebildeten flüchtigen Säuren festgestellt. Die Menge der Essigsäure, welche in Folge der Zerspaltung der zu prüfenden Substanz durch das Trypsin entstanden ist, kann dann aus der Gleichung:

$$X = S - A + B - C$$

berechnet werden. Fast alle Versuche mit der Bestimmung der während des Digerirens abgespaltenen Essigsäure wurden mit Tr. D. ausgeführt, wo die Portionen B und C der flüchtigen Säuren sehr gering waren. Zur Neutralisation der in 0,13 gr. Tr. D. von vornherein vorhandenen flüchtigen Säuren wurden nur 0,4 resp. 0,25 resp. 0,25 — im Mittel 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH verbraucht; C war für 0,13 gr. Tr. D. nach 12tägigem Digeriren 0,40 resp. 0,30 resp. 0,35 — im Mittel 0,35 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich. Für andere Präparate des Trypsins, besonders für den natürlichen Pankreassaft, können diese Werthe vermuthlich grösser sein.

Jetzt gehe ich zu der Beschreibung der Versuche über. Für jede Substanz sind die Anzahl der damit ausgeführten Versuche und die benutzten Trypsinpräparate angegeben.

Phenetol, $C_6H_5.O.C_2H_5$, von Kahlbaum bezogen. Siede-

punkt = 169—170° (750 mm. Bar.).¹⁾ Phenol konnte nach Digeriren mit Trypsin weder in der Flüssigkeit unmittelbar, noch im Destillate derselben gefunden werden (3 Versuche; Tr. A.). Alkohol war im Destillate durch die Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure²⁾ auch nicht zu entdecken (2 Versuche; Tr. D.).

Aethylanilin, $C_6H_5.NH.C_2H_5$ (Kahlbaum). Siedepunkt = 206—207° (750 mm. Bar.). Kein Anilin im Destillate der mit Trypsin digerirten Substanz (3 Versuche; Tr. A., Tr. D.).

Carbanilsaures Aethyl, $C_6H_5.NH.COO.C_2H_5$ (Kahlbaum). Schmelzpunkt 48,5—49°. Diese Substanz zersetzt sich unter Bildung der Spuren von Anilin schon beim Destilliren mit 1%iger Sodalösung; in Folge dessen wurden die Reactionen auf Anilin mit der nicht destillirten Flüssigkeit ausgeführt. Anilin war in der Flüssigkeit nach dem Digeriren mit Trypsin nicht nachweisbar (1 Versuch mit Tr. C.; 2 Versuche mit Tr. D.). Phenol (1 Versuch; Tr. C.) und Alkohol (Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure;²⁾ 1 Versuch mit Tr. C.; 2 Versuche mit Tr. D.) konnten in dem Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit ebensowenig gefunden werden.

Phenacetin, $(CH_3CO)NH.C_6H_4.OC_2H_5$ (aus einer Apotheke). Die mit Trypsin digerirte und dann mit Salzsäure neutralisirte Flüssigkeit wurde auf ihr Verhalten gegen Eisenchlorid und gegen Chlorkalk resp. Natriumhypochlorit geprüft, wobei kein p-Aminophenetol, $NH_2.C_6H_4.OC_2H_5$ gefunden wurde (1 Versuch; Tr. C.). Im Destillate derselben Flüssigkeit war der Alkohol durch die Probe mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure²⁾ nicht zu entdecken. Beim Digeriren mit Trypsin bildete sich auch keine Essigsäure; in 2 Versuchen (Tr. D.) entsprach die Menge der flüchtigen Säuren, die in Folge der Spaltung der Substanz durch Trypsin entstanden, d. h. X: — 0,15 resp. 0,0 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH, wobei A, d. h. die Menge der in der Flüssigkeit nach dem Digeriren der Substanz mit gekochter Trypsinlösung

1) Alle Temperaturangaben sind corrigirt.

2) Die Jodoformprobe war leider nicht anwendbar, da die Substanz selbst bei dieser Probe braune amorphe Niederschläge gibt.

gefundenen flüchtigen Säuren, 0,7 resp. 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich war; in einem Versuche mit Tr. C. war $S = 0,2$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH gleich.

Diphenylharnstoff, $\text{CO} < \begin{smallmatrix} \text{NH.C}_6\text{H}_5 \\ \text{NH.C}_6\text{H}_5 \end{smallmatrix}$ (Kahlbaum).

Schmelzpunkt = 243° . Nach dem Digeriren mit Trypsin kein Anilin im Destillate (2 Versuche; Tr. D.).

Sulfocarbanilid, $\text{CS} < \begin{smallmatrix} \text{NHC}_6\text{H}_5 \\ \text{NHC}_6\text{H}_5 \end{smallmatrix}$ (Kahlbaum). Mit

einer Sodalösung darf die Substanz nicht destillirt werden, da dabei eine geringe Menge von Anilin und Schwefelwasserstoff entsteht. Unmittelbar in der Flüssigkeit waren nach Digeriren mit Trypsin weder Anilin noch Schwefelwasserstoff vorhanden (je 2 Versuche mit Tr. C. und Tr. D.).

Acetylharnstoff, $\text{CO} < \begin{smallmatrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH}(\text{COCH}_3) \end{smallmatrix}$, habe ich nach

dem Verfahren von Zinin¹⁾ aus Harnstoff und Acetylchlorid dargestellt und durch vier Mal wiederholte Krystallisation aus heissem Wasser und einmaliges Umkrystallisiren aus heissem Alkohol gereinigt. Die Substanz schmolz bei 216° ; nach Zinin schmilzt sie bei 200° , nach Behrend²⁾ bei 212° . Die Menge der durch Einwirkung von Tr. D. abgespaltenen Essigsäure (X) waren: 0,5; 0,25; 0,65; 0,5 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 1,3$; 1,8; 2,3; 2,9; die Menge der für die Versuche genommenen Substanz war 0,10—0,27 gr. Da die Substanz somit beim Destilliren nach der Digestion mit Soda allein schon eine merkliche Menge Essigsäure lieferte, waren die Resultate dieser Versuche zweifelhaft. Es wurde noch ein Versuch in grösserem Massstabe ausgeführt, indem 0,5 gr. Acetylharnstoff mit 0,65 gr. Tr. D. in 100 ccm. 0,5%iger Sodalösung gelöst, 13 Tage lang digerirt wurden; $X = 0,0$; $A = 5,2$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Somit war keine Zersetzung der Substanz eingetreten und die früher gefundenen Schwankungen in der Menge der Essigsäure waren zufällige. Die Grösse von A ist der Menge der genommenen Substanz ungefähr proportional.

1) Zinin, Ann. der Chemie, Bd. 92, S. 405.

2) Behrend, Ibid., Bd. 229, S. 30.

Biuret, $\text{NH}_2\text{CO.NH.CO.NH}_2$, habe ich nach dem Verfahren von Wiedemann¹⁾ aus Harnstoff dargestellt und die mit Bleiessig behandelte Substanz drei Mal aus heissem Wasser, ein Mal aus heissem verdünnten Ammoniak und nochmals aus heissem Wasser umkrystallisirt. Der Schmelzpunkt des Biurets wird zu 190° angegeben,²⁾ doch bildet die Substanz bei $189\text{--}190^\circ$ nur eine halbflüssige Masse, die bald wieder dicker zu werden und zu sublimiren anfängt.

Mit Biuret wurde untersucht, ob die Biuretreaction bei längerem Digeriren mit Trypsinlösung verschwindet oder nicht. Bei Tr. C. (3 Versuche) wurde nach 3 Monaten keine Abschwächung der Biuretreaction im Vergleich mit der der Kontrollproben gefunden, sogar in dem Versuche nicht, wo nur 0,02 gr. Biuret genommen wurde. Ebenso wenig konnte eine Zersetzung des Biurets in einem Versuche mit Tr. D. constatirt werden, wo die Intensität der Reactionen mit Hülfe eines Colorimeters geschätzt wurde.

Acetanilid, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}(\text{COCH}_3)$ (aus einer Apotheke). Beim Digeriren der Substanz mit Trypsinlösung war keine Bildung von Anilin (1 Versuch; Tr. C.) und keine Abspaltung von Essigsäure zu constatiren (2 Versuche mit Tr. D.; $X = -0,2$ resp. 0,0 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 0,4$ resp. 0,2 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH).

o-Acettoluid, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)\text{NH}(\text{COCH}_3)$ (Kahlbaum). Schmelzpunkt $= 109\text{--}109,5^\circ$. Durch Einwirkung von Tr. D. entstand kein Toluidin (1 Versuch) und wurde keine freie Essigsäure gebildet (2 Versuche; $X = 0,0$ resp. 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 0,3$ resp. 0,5 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH).

Sulfanilsäure, $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{OH}$ (Kahlbaum). Im Destillate des Gemisches war kein Anilin vorhanden (2 Versuche; Tr. D.).³⁾

Hippursäure, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})\text{NH.CH}_2\text{COOH}$ (Kahlbaum). Beim Digeriren dieses Präparates mit Petroläther waren in der Lösung keine Spuren von Benzoësäure zu entdecken; Schmelzpunkt

1) Wiedemann, Ann. d. Chem., Bd. 68, S. 324.

2) Beilstein, Handb. der organ. Chem., I, S. 1307.

3) Die Substanz selbst gibt mit Natriumhypochlorit eine orange bis rothe Färbung.

= 190,5—191,5°. Für die Versuche wurde die Säure mit Natriumcarbonat neutralisirt; es wurden 3 Versuche mit je 0,5 gr. Hippursäure und 20 ccm. der Lösung von Tr. A., 1 Versuch mit 0,1 gr. Hippursäure und 0,13 gr. Tr. D. und 1 Versuch mit 0,9 gr. Hippursäure und 0,65 gr. Tr. D. angestellt. Nach Digeriren während 8—37 Tagen wurden die Mischungen drei Mal mit Petroläther extrahirt, dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und wiederum zwei Mal mit Petroläther geschüttelt. Nach Abdestilliren des Petroläthers von diesen zwei letzten Auszügen blieben nur winzige fettartige Rückstände, die keine Reactionen der Benzoësäure gaben: der in dem Versuche mit 0,9 gr. Hippursäure erhaltene und über Schwefelsäure getrocknete Rückstand wog z. B. nur 0,0008 gr.

Anilid der Phenoxylessigsäure (Phenylätherglykolsäure), $C_6H_5 \cdot O \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$, habe ich aus der Phenoxylessigsäure dargestellt, welche nach Verfahren von Giacosa¹⁾ durch Einwirkung von Natronhydrat auf eine Mischung von Phenol und Chloressigsäure erhalten wurde. Die Phenoxylessigsäure wurde mit Thierkohle entfärbt und zweimal aus heissem Wasser umkrystallisirt. Die reine Säure wurde dann mit Anilin bei 150—155° erwärmt²⁾ und das gebildete rohe Anilid vier Mal aus heissem Alkohol krystallisirt. Die reine trockene Substanz schmolz bei 100°; nach Fritzsche liegt der Schmelzpunkt bei 99°. Die Verbindung enthielt keine Spuren von freiem Anilin resp. von dessen Salze. Beim Kochen mit Wasser ging ein geringer Theil der Substanz in das Destillat über, welches in Folge dessen eine schwache Opalescenz mit Bromwasser gab. Anilin wurde dabei nicht abgespalten, aber nach kurzem Kochen der Substanz mit 1%iger Sodalösung wurde eine schwache Reaction auf Anilin erhalten; dieselbe Reaction wurde (wenigstens in einigen Versuchen) auch beim Digeriren des Anilids mit 1%iger Sodalösung bei Brüttemperatur beobachtet. In Folge dieser leichten, obgleich sehr geringen Zersetzlichkeit der Substanz wurde bei den Versuchen mit

1) P. Giacosa, Journ. f. prakt. Chem., [2], Bd. 19, S. 396.

2) P. Fritzsche, Journ. f. prakt. Chem. [2], Bd. 20, S. 280.

Trypsin die Intensität der Reaction auf Anilin mit der in den Kontrollproben erhaltenen Reaction verglichen, wobei kein Unterschied beobachtet werden konnte. Es ergab sich also, dass kein Anilin durch Einwirkung von Trypsin auf das Anilid der Phenoxylessigsäure abgespalten war (je 2 Versuche mit Tr. C. und Tr. D.). Ebenso wenig konnte Phenol im Destillate der mit Weinsäure angesäuerten Flüssigkeit entdeckt werden (2 Versuche mit Tr. C.; 1 Versuch mit Tr. D.)

o-Acetylamidobenzoësäure, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{NH}.\text{C}_6\text{H}_4.\text{COOH}$, wurde durch Oxydation des o-Acettoluids mit Kaliumpermanganat nach Verfahren von Bedson und King¹⁾ dargestellt. Die rohe Säure wurde mit Thierkohle entfärbt und dreimal aus kochendem Wasser umkrystallisirt. Die erhaltene Substanz schmolz bei $180-181^\circ$; von Bedson und King ist der Schmelzpunkt zu $179-180^\circ$ angegeben. Für die Versuche wurde die Säure als Natronsalz benutzt. Durch die Einwirkung des Tr. D. wurde keine Abspaltung der Essigsäure constatirt: $X = 0,0; - 0,1; + 0,05$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH: $A = 0,2 - 0,5$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH.

Salol, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COO}.\text{C}_6\text{H}_5$, (aus einer Apotheke) schmolz bei 42° . Da diese Substanz, wie es Nencki²⁾ nachgewiesen hat, durch Soda bei Brüttemperatur zersetzt wird, so musste ich die Menge der bei den Versuchen abgespaltenen Salicylsäure resp. die Menge des zurückgebliebenen Salols mit den Kontrollproben vergleichend bestimmen. Zu dem Zwecke habe ich 1,1 gr. Salol mit 100 ccm. 0,5 %iger Sodalösung, so viel Thymol, als noch vollständig gelöst wurde, und 0,65 gr. Tr. D. während 65 Stunden bei Brüttemperatur digerirt, das zur Krystallisation gebrachte Salol auf einem gewogenen Filter abfiltrirt, mit 35 ccm. kaltem Wasser ausgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet; sowohl in diesem wie auch in dem Kontrollversuch wurden 96% des Salols zurückerhalten. Als 0,04 gr. Salol mit 50 ccm. Wasser, 0,04 gr. Soda, 0,33 gr. Tr. D.

1) P. P. Bedson and A. J. King, Journ. of the chem. Soc., Bd. 37, S. 752.

2) M. Nencki, Therap. Monatsh., 1887. November (Maly's Jhrsb., Bd. 17, S. 85).

und ein wenig Thymol digerirt wurden, ergab die colorimetrische Bestimmung, dass die Menge der abgespaltenen Salicylsäure 0,0007 gr. betrug; bei dem Kontrollversuch wurden 0,0006 gr. Salicylsäure gefunden.

Essigsalicylsäure, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O}.\text{C}_6\text{H}_4.\text{COOH}$, habe ich nach dem Verfahren von Kraut¹⁾ durch Erwärmen der Salicylsäure mit Acetylchlorid dargestellt und zweimal aus viel kochendem Wasser, worin die Substanz schwer löslich ist, umkrystallisirt. Die erhaltene Verbindung schmolz bei 120° ; Kraut gibt den Schmelzpunkt zu $118\text{--}118,5^\circ$ an. Die Farbenreaction mit Eisenchlorid ist zum Nachweis der Abspaltung der Salicylsäure durch Trypsin nicht anwendbar, da dieselbe Reaction auch Essigsalicylsäure gibt. Bei der Bestimmung der Menge der abgespaltenen Essigsäure (3 Versuche mit Tr. D. und Natriumessigsalicylat) wurden folgende Werthe gefunden: $X = 0,1; 0,0; 0,0$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 1,9; 0,4; 1,1$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH.

p-Diacetylamidophenol, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O}.\text{C}_6\text{H}_4.\text{NH}(\text{COCH}_3)$, wurde nach dem Verfahren von Ladenburg²⁾ durch Erwärmen von p-Amidophenol mit Essigsäureanhydrid dargestellt. Die Substanz, dreimal aus kochendem Wasser unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt, schmolz bei $153,5^\circ$; von Ladenburg ist der Schmelzpunkt zu $150\text{--}151^\circ$ angegeben. Beim Digeriren des p-Diacetylamidophenols mit Tr. D. wurden gefunden: $X = 0,35; 0,75; 2,25$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 1,4; 2,0; 2,6$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH;³⁾ bei einem Versuch mit Tr. C. waren $X = 1,5$ und $A = 3,8$ ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Da die Resultate dieser Versuche zweifelhaft waren, so habe ich noch zwei Versuche in grösserem Massstabe gemacht, indem ich 0,8 resp. 1,3 gr. p-Diacetylamidophenol, 100 ccm. 0,5%iger Sodalösung und 0,65 gr. Tr. D. genommen habe; diese Versuche dauerten 11 resp. 13 Tage; $X = 5,7$ resp. 9,7 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; $A = 5,9$ resp. 8,7 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH. Somit war in allen 6 Versuchen eine grössere

¹⁾ K. Kraut, Annal. der Chem., Bd. 150, S. 10.

²⁾ Ladenburg, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 9, S. 1528.

³⁾ Die Menge der für die Versuche genommenen Substanz war: 0,13; 0,21; 0,30 gr.; die Dauer der Versuche war: 13; 10; 38 Tage. Somit ändern sich X und A in demselben Sinne, wie die Menge der genommenen Substanz und die Dauer der Versuche.

Abspaltung der Essigsäure in den Proben constatirt, wo das Trypsin wirkungsfähig war; die Bestimmung der Menge von A zeigt, dass das p-Diacetylamidophenol schon durch 0,5%ige Sodalösung allein deutlich zersetzt wird.

Salicylsäureanilid, $C_6H_4(OH)CO.NH.C_6H_5$, wurde nach dem Verfahren von Kupferberg¹⁾ (durch Einwirkung von Phosphortrichlorid auf ein Gemisch von Salicylsäure und Anilin) dargestellt und fünfmal aus heissem, verdünntem Alkohol unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt. Die reine Substanz schmolz bei 136,5—137°; von Kupferberg ist der Schmelzpunkt zu 132° angegeben; nach Wanstrat liegt er bei 134 bis 135°. Mit Eisenchlorid gibt die Substanz eine violette Färbung. Bei der Einwirkung von Trypsin war keine Abspaltung von Anilin zu constatiren (1 Versuch mit Tr. C.; 3 Versuche mit Tr. D.).

ab-Acetylphenylhydrazin, $C_6H_5.NH.NH(COCH_3)$, habe ich nach dem Verfahren von E. Fischer²⁾ aus Phenylhydrazin und Essigsäureanhydrid dargestellt und durch dreimal wiederholte Krystallisation aus kochendem Wasser unter Zusatz von Thierkohle gereinigt. Die Verbindung schmolz bei 128—129°; nach E. Fischer schmilzt sie bei 128,5°. Durch die Einwirkung von Tr. D. wurde keine Essigsäure abgespalten: X = — 0,25 resp. + 0,25 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH; A = 1,1 resp. 0,7 ccm. $\frac{1}{10}$ NaOH.

Bis jetzt habe ich somit folgende Verbindungen auf ihr Verhalten gegen Trypsin untersucht:

- | | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 1) $C_6H_5.O.C_6H_5$ | 11) $NH_2.C_6H_4.SO_3OH$ |
| 2) $C_6H_5.NH.C_6H_5$ | 12) $(C_6H_5CO)NH.CH_3.COOH$ |
| 3) $C_6H_5.NH.COO.C_6H_5$ | 13) $C_6H_5.O.CH_3.CO.NH.C_6H_5$ |
| 4) $(CH_3.CO)NH.C_6H_4.OC_6H_5$ | 14) $(CH_3CO)NH.C_6H_4.COOH$ |
| 5) $C_6H_5.NH.CO.NH.C_6H_5$ | 15) $OH.C_6H_4.COO.C_6H_5$ |
| 6) $C_6H_5.NH.CS.NH.C_6H_5$ | 16) $(CH_3CO)O.C_6H_4.COOH$ |
| 7) $NH_2.CO.NH(COCH_3)$ | *17) $(CH_3CO)O.C_6H_4.NH(COCH_3)$ |
| 8) $NH_2.CO.NH.CO.NH_2$ | 18) $OH.C_6H_4.CO.NH.C_6H_5$ |
| 9) $C_6H_5.NH(COCH_3)$ | 19) $C_6H_5.NH.NH(COCH_3)$ |
| 10) $CH_3.C_6H_4.NH(COCH_3)$ | |

1) H. Kupferberg, Journ. f. prakt. Chem., [2], Bd. 16, S. 442.

2) E. Fischer, Ann. der Chem., Bd. 190. S. 129.

Die mit diesen 19 Verbindungen ausgeführten Versuche haben ein negatives Resultat geliefert. Die einzige Ausnahme bilden 6 Versuche mit p-Diacetylamidophenol, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{O}.\text{C}_6\text{H}_4.\text{NH}(\text{COCH}_3)$, bei denen ein constantes Plus an Essigsäure bei den Versuchen mit wirksamen Trypsinlösungen gefunden wurde. Vorläufig kann ich aber mein Urtheil über diese Versuche nur mit Reserve aussprechen, da die Substanz schon beim Digeriren mit Soda allein merklich zersetzt wird. Doch ist es auffallend, dass alle Versuche ohne Ausnahme eine grössere Zersetzung der Substanz in den Proben zeigen, wo die Trypsinlösung vorher nicht gekocht wurde, sonst aber alle Bedingungen der Versuche die gleichen waren. Weitere in dieser Richtung auszuführende Untersuchungen sollen zeigen, ob auch die anderen Verbindungen von der dem p-Diacetylamidophenol analogen Constitution durch Trypsin zerspalten werden oder nicht. Für das p-Diacetylamidophenol beträgt die Menge der vermuthlich durch das Trypsin selbst zersetzten Substanz etwa 20%, wenn die Abspaltung von nur einem Reste der Essigsäure statt hat, resp. etwa 10%, wenn die beiden Reste derselben abgespalten werden.

Was die Versuche mit der Hippursäure betrifft, so existirt hier ein scheinbarer Unterschied zwischen den von Blank im Laboratorium von Nencki¹⁾ und den von mir erhaltenen Resultaten, da Blank mit dem Grübler'schen Trypsin eine Zerspaltung der Hippursäure gefunden hat. Da aber, wie mir mitgetheilt wurde, die Methode der Darstellung von Trypsin in der neueren Zeit von Grübler geändert wurde, so ist dieser Unterschied wohl durch Verschiedenheit der verwendeten Trypsin-Präparate zu erklären. Man kann z. B. vermuthen, dass das von Blank für seine Versuche benutzte Trypsin auch das fettzerspaltende Ferment enthalten hat, während das von mir verwendete Präparat davon, wie gesagt, frei war.

Ich gedenke meine Versuche über die Wirkung des Trypsins auf einfachere Verbindungen fortzusetzen und auch den natürlichen Pankreassaft zu diesem Zwecke zu benutzen.

Strassburg, den 3. Juni 1899.

1) M. Nencki, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 20, S. 377.

Fütterungsversuche mit Indol.

Von
Eyvin Wang.

(Aus dem chem. Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 8. Juni 1899.)

Indol als Quelle der Indicanurie wurde zuerst von Jaffé¹⁾ nachgewiesen. Nach subcutanen Injectionen von Indol erschienen constant sehr beträchtliche Mengen von Indican im Harn. Die Ausscheidung fing schon wenige Stunden nach der Einspritzung an und war gewöhnlich innerhalb 24 Stunden beendigt.

Die Versuche wurden von Masson²⁾ wiederholt und zwar mit quantitativer Bestimmung der ausgeschiedenen Indigomenge. Einem Kaninchen wurde 0,135 g Indol subcutan injicirt; 36 Stunden nachher war der Harn wieder indicanfrei. Von Indigo wurde 0,0455 g nachgewiesen, was 30% des gegebenen Indols entspricht.

Quantitative Bestimmungen sind auch von Jaffé³⁾ ausgeführt worden; nach Injectionen von 0,15—0,20 g Indol wurden 21—27% und nach 0,05 g 16% als Indigo wiedergefunden.

1) Jaffé, Ueber den Ursprung des Indicans im Harn. Centralblatt f. d. med. Wissensch., 1872, Bd. I, S. 2.

2) Masson, Des Matières colorantes du Groupe Indigo, considérées au Point de Vue Physiologique. Arch. de Physiologie norm. et path. Nr. 2 I, 1874, S. 960.

3) Jaffé, Ueber die Ausscheidung des Indicans unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Arch. f. patholog. Anatomie, Bd. 70, 1877, S. 78.

Durch Indolfütterung hat Baumann¹⁾ gezeigt, dass das Harnindican eine gepaarte Schwefelsäure ist, es lässt sich nämlich nach Indoleingabe eine gleichzeitige Vermehrung des Indicans und der gepaarten Schwefelsäuren constatiren. Nach 0,9 g reinem Indol, an einem Tage in verschiedenen Portionen mit dem Futter gegeben, dauerte die Ausscheidung über zwei Tage.

Ausser der indigobildenden Aetherschwefelsäure wurde auch eine andere Substanz gefunden, welche sich spontan zersetzt und neben Indigo keine Schwefelsäure abspaltet. Schmiedeberg²⁾ hält es für wahrscheinlich, dass diese Substanz eine gepaarte Glycuronsäure ist; er hat nämlich nach Benzolfütterungen das ausgeschiedene Phenol theils als Aetherschwefelsäure, theils als gepaarte Glycuronsäuren wiedergefunden. Das Vorkommen einer Indoxylglycuronsäure ist auch in der That von Külz³⁾ nach Indolfütterung nachgewiesen worden; G. Hoppe-Seyler⁴⁾ erwähnt auch das Auftreten dieser Verbindung nach Fütterung mit Orthonitrophenylpropionsäure.

Toxische Wirkung des Indols ist von Nencki⁵⁾ beobachtet worden; ein Hund bekam nach Eingabe von 2 g Indol in 24 Stunden starke Diarrhoe von Hämaturie begleitet.

Baumann und Brieger⁶⁾ sahen nach weit grösseren Mengen keine Intoxicationssymptome; nach mehr als 5 g an einem Tage gegeben wurde der Harn röthlichbraun.

1) Baumann, Zur Kenntniss der aromatischen Substanzen des Thierkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. I, 1877/78, S. 67.

2) Schmiedeberg, Ueber Oxydationen und Synthesen im Thierkörper. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XIV, 1881, S. 307.

3) Külz, Zur Kenntniss der synthetischen Vorgänge im thierischen Organismus. Arch. f. d. gesammte Physiologie, Bd. XXX, 1883, S. 485.

4) G. Hoppe-Seyler, Beiträge zur Kenntniss der indigobildenden Substanzen im Darm und des künstlichen Diabetes mellitus. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VII, 1882/83, S. 425.

5) Nencki, Zur Geschichte des Indols und der Fäulnisprocesse im thierischen Organismus. Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. IX, 1876, S. 300.

6) Baumann und Brieger, Ueber Indoxylschwefelsäure, das Indican des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. III, 1879, S. 255.

Nachdem es mir gelungen war, quantitative Indicanbestimmungen nach einer bequemen und genauen Methode vorzunehmen, habe ich im Wintersemester 1896/97 auf Veranlassung des Herrn Prof. E. Salkowski eine Reihe von Fütterungsversuchen mit Indol ausgeführt, und zwar um Folgendes zu untersuchen:

1. Das Verhältniss zwischen dem gegebenen Indol und der ausgeschiedenen Indigomenge.

2. Das Verhältniss zwischen dem gegebenen Indol und der ausgeschiedenen Aetherschwefelsäuremenge.

3. Das Verhältniss zwischen dem ausgeschiedenen Indigo und den ausgeschiedenen Aetherschwefelsäuren.

Zu diesem Zwecke wurde eine mittelgrosse Hündin benutzt, die im Käfig gehalten wurde. Der Harn wurde zweimal täglich mit Katheter entleert und in Tagesmengen gesammelt. Während der Versuchsperioden bekam das Thier 450 g Fleisch, 50 g Speck und 150 g Reis pro Tag, es wurde jeden Morgen nach der Entleerung von Harn und Faeces gewogen.

Die Indicanbestimmungen wurden durch Titrirung mit Kaliumpermanganat ausgeführt; gewöhnlich wurden 200 ccm. in Arbeit genommen, mit 50–60 ccm. Bleizuckerlösung gefällt, wonach 150 ccm. des Filtrates mit Obermayer's Reagens geschüttelt wurden.¹⁾

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach dem Verfahren von Kjeldahl ausgeführt.

Zu den Bestimmungen von Gesamt- und Aetherschwefelsäure wurde die Methode von Baumann-Salkowski benutzt.

Das Indol stammte aus den Versuchen von E. und H. Salkowski über die Eiweissfäulniss;²⁾ der Schmelzpunkt war 52°.

Es wurde zuerst versucht, das Thier in Stickstoffgleichgewicht zu bringen, in der Hoffnung, dass dabei auch die tägliche Aetherschwefelsäure-Ausscheidung einen nahezu con-

¹⁾ Wang, Ueber die quantitative Bestimmung des Harnindicans. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898, S. 406.

²⁾ Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VIII, 1883, 84, S. 436 ff.

stanten Werth bilden werde, wie es E. Salkowski¹⁾ an einem Hund beobachtet hat, der sich annähernd im Stickstoffgleichgewicht befand.

Die nachstehende Tabelle zeigt indessen, dass solche Verhältnisse nicht zu erreichen waren.

Datum	Gewicht	Harn- menge	Sp. v.	N im Harn in g	Aether- schwefelsäure (BaSO ₄ in g) (a)	Indigo in mg (b)	$\frac{a}{b}$	Anmerkung
1896								
23. XI.	14 950							
24.	15 015	930	1013	10,2	0,212	13,1	16,2	Faeces
25.	200	800	1016	10,2	0,186	13,1	14,2	
26.	255	700	1017	8,6	0,157	14,4	10,9	„
27.	540	500	1022	9,8	0,144	10,4	13,8	
28.	600	785	1014	9,7	0,129	9,5	13,5	„
29.	930	620	1018	9,3	0,122	6,6	18,4	
30.	16 190	600	1019	9,1	0,144	13,6	10,6	„ 80 g = 23 g Trockensubstanz mit 6,13% N = 1,41 g
1. XII.	270	890	1014	9,9	0,125	8,6	14,5	Von $\frac{1}{12}$ gekochtes Fleisch.
2.	420	710	1017	10,2	0,157	6,2	25,3	
3.	470	940	1012	9,7	0,150	15,4	9,7	„
4.	630	750	1018	10,8	0,126	11,9	10,6	
5.	910	695	1018	10,6	0,106	10,1	10,4	
6.	980	970	1012	11,0	0,144	11,8	12,2	
7.	980	810	1015	9,8	0,165	19,3	8,6	„
8.	17 180	665	1020	10,2	0,120	11,9	10,9	
9.	280	755	1020	10,8	0,110	5,3	20,8	
10.	410	660	1023	12,8	0,127	9,5	13,3	„

Nach 17 Tagen war also noch kein Stickstoffgleichgewicht erreicht. Die Ausscheidung durch den Harn war am letzten Tage nur bis 12,8 g gestiegen und hatte sich sonst zwischen 9 und 11 g gehalten. Dagegen berechnet sich die Stickstoffzufuhr, wenn man den Stickstoffgehalt des Fleisches zu 3,4% und den des Reises zu 1% setzt, auf 16,8 g.

¹⁾ Salkowski, Ueber die quantitative Bestimmung der Schwefelsäure im Harn. Arch. f. patholog. Anatomie, Bd. 79, 1880, S. 554.

In 17 Tagen sind also:

N mit der Nahrung aufgenommen . . .	285,6 g
N durch den Harn ausgeschieden . . .	172,5 »
Differenz . . .	+ 113,1 g
Gewichtszunahme 2440 g entspricht ca.	81,0 »
Rest . . .	32,1 g N.

Der gefundene Rest von 32 g Stickstoff ist also vom Organismus nicht ausgenutzt worden. Diese Menge scheint indessen auffallend gross zu sein, und deshalb wurde an einem Tage der Stickstoffgehalt der Faeces bestimmt (am 30. XI) und zu 1,41 g gefunden, also nicht abnorm hoch für die Faeces von 2 Tagen.

Endlich wurde auch, um das Verhältniss zwischen Stickstoff und Schwefel zu untersuchen, an einzelnen Tagen die totale Schwefelausscheidung bestimmt; die Resultate zeigten jedoch, wie aus dem Folgenden hervorgeht, keine Abweichung der normalen Werthe:

Datum	Harn- menge	N im Harn	Total-Schwefel		N H ₂ SO ₄
			als BaSO ₄	als H ₂ SO ₄	
26. XI.	700	8,6	4,1134	1,7276	5,0
2. XII.	710	10,2	4,6746	1,9633	5,2
3. XII.	940	9,7	4,6535	1,9545	5,0
7. XII.	810	9,8	4,6433	1,9502	5,0
9. XII.	755	10,8	4,9588	2,0827	5,2

Mein Versuch war aber nicht als eine exacte Stoffwechseluntersuchung geordnet. Faeces wurden ja nur einmal auf Stickstoff und die gegebene Nahrung wurde gar nicht analysirt. Der Stickstoffumsatz des Thieres war auch nur eine Nebensache und gehörte nicht in meinen Plan, da dieser ja nur in Untersuchungen über das Verhältniss zwischen Indican und Aetherschweifelsäure unter Indolfütterung bestand.

Die Aetherschweifelsäure-Ausscheidung stellte nicht, wie erwartet war, eine fast constante Grösse dar; von den zwei ersten Tagen, in welchen die Werthe möglicher Weise wegen der früheren Ernährung höher als die übrigen waren, abgesehen,

wird man indessen eine Aetherschwefelsäure-Ausscheidung finden, die zwischen 12 und 14 cg ausgedrückt als BaSO_4 pro Tag liegt, doch mit einzelnen Variationen, die sowohl höher (max. 16,5 cg) als niedriger (min. 10,6 cg) sind. Die durchschnittliche Ausscheidung vom 26. XI. bis 10. XII. macht 13,5 cg aus. Auch wenn man in dieser Zeit Durchschnittszahlen für kürzere Perioden auf je 5 Tage ausrechnet, wird man ziemlich constante Werthe finden, die von den obengenannten nicht besonders abweichen:

vom 26. XI. bis 30. XI.	13,9 cg pro Tag
» 1. XII. » 5. XII.	13,3 » » »
» 6. XII. » 10. XII.	13,3 » » »

Wie die Aetherschwefelsäuren, verhält sich auch das Indican, die Variationen von Tag zu Tag sind jedoch etwas grösser. Das durchschnittliche Tagesquantum vom 26. XI. bis 10. XII. macht 10,9 mg aus (max. 19,3, min. 5,3 mg). Bezüglich des Indicans wird man auch gut übereinstimmende Durchschnittswerthe für dieselben kürzeren Perioden wie oben finden:

vom 26. XI. bis 30. XI.	10,9 mg pro Tag
» 1. XII. » 5. XII.	10,4 » » »
» 6. XII. » 10. XII.	11,4 » » »

Zwischen Aetherschwefelsäuren und Indican gibt es kein constantes Verhältniss, der durchschnittliche Quotient ist 13,8, mit Schwankungen von 25,3 bis 8,6.

Bis zum 1. XII. wurde ungekochtes Fleisch gegeben, welches in Portionen, die 3—4 Tage dauerten, eingekauft war, dasselbe wurde im Eiskasten aufbewahrt und sah immer ganz frisch aus. Trotzdem wäre es ja denkbar, dass eine variirende Bakterienzufuhr Einfluss auf das Indican und die Aetherschwefelsäurebildung haben könnte. Das Kochen des Fleisches unmittelbar vor der Fütterung hat nach Peurosch¹⁾ keinen Einfluss auf die Ausscheidung des Indicans; Haagen²⁾ hat auch

¹⁾ Peurosch, Beiträge zur Lehre über die Entstehung des Indicans im Thierkörper. — Dissertation. Königsberg 1877, S. 22.

²⁾ Haagen, Ueber den Einfluss der Darmfäulniss auf die Entstehung der Kynurensäure beim Hunde. — Dissertation. Königsberg 1887, S. 12.

keine hervortretende Aenderung der qualitativen Indicanreaction bei Sterilisirung der Nahrung constatirt, dagegen nahm die Kynurensäureausscheidung um 40,9% ab, nachdem statt ungekochten Fleisches gekochtes gegeben war. Albu¹⁾ beobachtete keine wesentliche Verminderung der Fäulnisprodukte des Eiweisses bei Gebrauch von sterilisirter Nahrung.

Das Kochen des Futters änderte bei meinen Versuchen weder Indican noch Aetherschweifelsäure-Ausscheidung, die täglichen Schwankungen wurden auch nicht weniger hervortretend.

Da ich aber constante Durchschnittswerthe sowohl für Indican als Aetherschweifelsäure constatirt hatte, fing ich am 11. XII. mit den Indolfütterungen an.

Die abgewogene Indolmenge wurde auf ein Stückchen ungekochtes Fleisch geschüttet, dies wurde zusammengerollt und von dem Hunde ganz ohne Widerwillen verschluckt.

Das Resultat dieser Fütterungsversuche geht aus folgender Tabelle hervor:

Dat.	Gewicht	Harn	Sp. v.	N	Total- schwe- fel- säure als BaSO ₄	Aether- schwe- fel- säure als BaSO ₄ (a)	Indigo (b)	$\frac{a}{b}$	Anmerkungen
1896 6. XII.	16 980	970	1012	11,0		0,144	11,8	12,2	
7.	980	810	1015	9,8		0,165	19,3	8,6	Faeces
8.	17 180	665	1020	10,2		0,120	11,9	10,9	
9.	280	755	1020	10,8		0,110	5,3	20,8	
10.	410	660	1023	12,8		0,127	9,5	13,3	"
Durchschnitt der I. Vorperiode . . .						0,133	11,4		

Indolperiode I.

11.	17 430	915	1016	11,8	1,305	521,6	2,5	> 1,0 g Indol Albuminurie	
12.	460	535	1025	9,9	1,301	611,5	2,1	> 1,0 " " " u. Blut	
13.	730	560	1023	11,2	0,805	244,6	3,3	0,50 " " " " "	

¹⁾ Albu, Ueber den Einfluss verschiedener Ernährungsweise auf die Darmfäulnis. Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 32, S. 510.

Dat.	Gewicht	Harn	Sp. v.	N	Total- schwefel- säure als BaSO ₄	Aether- schwefel- säure als BaSO ₄ (a)	Indigo (b)	a b	Anmerkungen
14.	17 900	600	1023	11,6		0,158	16,6	9,5	Albuminurie u. Blut
15.	920	620	1022	12,2		0,169	30,7	5,5	Faeces breiig » » »
16.	18 100	580	1023	12,3		0,241	53,6	4,5	» » »
17.	17 940	530	1022	9,9		0,178	27,2	6,5	» flüssig
18.	18 270	640	1016	9,6		0,205	34,9	5,9	» breiig
19.	270	625	1016	9,0		0,220	26,0	8,5	» geformt

1897									
7. I.	20 670								
8.	770	540	1025	12,5	3,033	0,191	20,1	9,55	»
9.	850	715	1019	12,3	2,934	0,200	21,0	9,5	
10.	950	540	1025	12,5	2,657	0,164	17,5	9,4	
11.	21 140	595	1023	12,3	2,635	0,162	15,3	10,6	»
12.	230	535	1023	12,0	2,544	0,163	13,4	12,1	
13.	380	550	1022	11,3	2,177	0,165	12,6	13,1	»
14.	450	600	1020	11,7	2,160	0,149	12,6	11,8	
15.	530	595	1023	12,2	2,271	0,153	12,2	12,5	
Durchschnitt der II. Vorperiode						0,158	13,2		

Indolperiode II.

16.	21 650	585	1025	13,0	2,516	0,870	255,8	3,3	» 0,50 gr. Indol
17.	670	455	1031	13,3	2,659	0,542	158,7	3,4	0,25 » »
18.	21 720	710	1023	14,5	3,042	0,162	16,4	9,9	»
19.	720	545	1030	14,7	3,006	0,129	5,1	25,0	
20.	850	560	1030	15,4	3,185	0,085	6,1	14,0	»
Durchschnitt der III. Vorperiode						0,125	9,2		

Indolperiode III.

21.	21 850	880	1017	14,0	3,101	0,803	245,6	3,3	0,50 g Indol Schwache Albuminreact.
22.	800	530	1028	13,4	2,625	0,608	157,3	3,9	» 0,25 » » » »
23.	880	610	1025	13,7	2,833	0,161	14,1	11,4	
24.	980	665	1022	13,1	2,753	0,157	15,6	10,1	
25.	920	765	1021	15,3	2,907	0,187	18,4	10,1	
26.	800	620	1022	12,6	2,785	0,156	9,8	15,9	»
Durchschnitt der IV. Vorperiode						0,167	14,6		

Dat.	Gewicht	Harn	Sp. v.	N	Total- schwefel- säure als BaSO ₄	Aether- schwefel- säure als BaSO ₄ (a)	Indigo (b)	$\frac{a}{b}$	Anmerkungen
------	---------	------	--------	---	--	--	---------------	---------------	-------------

Indolperiode IV.

27.	21 930	575	1024	13,5	3,022	0,927	286,3	3,2	0,50 g Indol
28.	22 060	690	1020	13,2	2,655	0,590	121,1	4,8	» 0,25 »

29.	22 020	540	1025	12,7	2,862	0,171	14,1	12,1	
30.	21,700								» 4-5 halbflüssige
31.	900	320	1044	14,8	3,199	0,186	25,6	7,3	
1/2.	22 060	450	1047	14,7	3,036	0,169	16,8	10,1	»
2.	20 550	1026	12,9	2,704	0,143	9,7	14,7		
3.	100 480	1030	13,0	2,799	0,154	9,7	15,8		»
4.	70 505	1025	13,5	2,703	0,107	8,1	13,3		
Durchschnitt der V. Vorperiode . . .					0,135	9,2			

Indolperiode V.

5.	22,250	480	1031	13,7	2,736	0,488	137,4	3,6	0,25 g Indol
6.	290	560	1027	14,1	2,941	0,327	54,7	5,9	» 0,10 »
7.	210	800	1018	13,8	2,778	0,163	12,7	12,8	35 g Reis zurück
8.	110	400	1037	13,6	2,724	0,099	14,0	7,1	85 » »
9.	110	330	1043	12,8	2,729	0,105	10,2	10,3	

Den 19. XII. 96 wurde die Versuchsreihe abgebrochen und 8. I. 97 wieder aufgenommen. Der Hund bekam in der Zwischenzeit gemischte Abfälle; vom 7. I. wieder 450 g Fleisch, 50 g Speck und 150 g Reis. Auch dies Mal war Stickstoffbilanz nicht zu erreichen; das Thier zeigte auch jetzt eine rasche Gewichtszunahme.

Nach einigen Tagen trat doch eine sehr gleichmässige Ausscheidung von Aetherschwefelsäuren ein, wie die Indigomenge nach kurzer Zeit sich auch constant zeigte.

Ausser den früher ausgeführten Bestimmungen wurde die Gesamtschwefelsäure in dieser Periode auch täglich bestimmt.

Alles in Allem wurde also Indol in 5 Perioden, und zwar in wechselnder Menge von 2,5—0,35 gr. auf 3 und 2 Tage vertheilt gegeben.

Der Hund befand sich während der Indolperioden nicht so wohl wie sonst, er war ein wenig unruhig, der Appetit war nicht wie gewöhnlich; während sonst die ganze Portion auf ein Mal gefressen wurde, dauerte es während der Indolperioden mehrere Stunden, bis die ganze Portion verzehrt war. Zwei Tage nach der letzten Indoleingabe wurde vom Futter ein wenig Reis (35 und 80 g) übrig gelassen.

Auch während der Indolperioden zeigte das Thier Gewichtszunahme, nicht aber so rapid wie sonst. Die Stickstoffausscheidung durch den Harn war während der Indolfütterungen nicht vermindert.

Die Harnentleerungen geschahen nicht so regelmässig wie vorher, wo es sich vollständig genügend gezeigt hatte, die Katheterisirung zwei Mal täglich auszuführen, und die ganze Harnmenge zu sammeln. Während der Indolperioden wurde ausserdem der Harn zwischen 6 Uhr Nachmittags und 8 Uhr Morgens entleert und in eine Porcellanschale durch das Ausflussrohr des Käfigs gesammelt.

Deutliche Vergiftungssymptome wurden nach der ersten Indoleingabe beobachtet, das Thier bekam 2,5 g Indol auf 3 Tage vertheilt. Schon am ersten Tage war deutliche Albuminreaction nachweisbar. Am zweiten Tage gab der Harn auch deutliche Blutreaction. Eiweiss war 3 Tage und Blut 2 Tage nach der letzten Indoldarreichung noch nachweisbar. Ausserdem hatte diese Indolperiode eine Diarrhoe, welche 6 Tage dauerte, zur Folge, und von gesteigerter Indican- und Aetherschwefelsäure-Ausscheidung begleitet war.

Bei der Eingabe von 0,75 g Indol, auf zwei Tage vertheilt, enthielt der Harn nur ein Mal (Versuch 3) eine unbedeutende Menge Albumin. — Nach Versuch 4 trat eine acute Diarrhoe ein, welche nur einen Tag dauerte. Der Hund hatte damals Gelegenheit gehabt, aus dem Käfig herauszukommen; in 3 verschiedenen Arbeitsräumen im Laboratorium wurden am nächsten Morgen 4—5 Portionen halbflüssige Stühle

und ein bedeutendes Quantum Harn gefunden. Der 24 stündliche Harn war also nicht zu untersuchen. Den folgenden Tag war sowohl Indican als Aetherschwefelsäure in gesteigerter Menge vorhanden.

Unter sämmtlichen Fütterungsversuchen waren die Faeces bedeutend dunkler gefärbt als sonst, und war die Consistenz auch nicht vollständig so fest wie gewöhnlich. Deutlichen Indolgeruch konnte ich nie constatiren.

Das Indol scheint jedes Mal im Laufe von 24 Stunden vollständig ausgeschieden zu sein. Schon am ersten Tage nach jeder Indolperiode wurden wieder normale Werthe sowohl für Indol als Aetherschwefelsäuren gefunden.

Der Harn zeigte sich in den Indolperioden von dunklerer Farbe, speciell kam dies nach einigen Stunden zum Vorschein, und zwar nahm die Farbenintensität gegen die Oberfläche zu. Der Harn, welcher Nachmittags durch den Katheter entleert war, sowie der Theil, welcher im Laufe der Nacht aus dem Käfig gesammelt war, zeigten am ersten Tage des ersten Indolversuches eine reichliche Abscheidung von freiem Indigoblau, welches ein kupferglänzendes Häutchen auf der Harnoberfläche bildete. Eine so reichliche spontane Abspaltung von Indigo wurde nach den späteren Fütterungen nicht beobachtet; der Harn zeigte aber jedes Mal, wenn er Nachts über gestanden hatte, eine deutliche grüne Fluorescenz, und bei den Schwefelsäurebestimmungen wurde die alkalische Chlorbaryumfällung deutlich blau gefärbt.

Der Harn zeigte unter diesen Umständen eine stark reducirende Wirkung auf Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Um Glycuronsäure nachzuweisen, wurde keine genaue Untersuchung gemacht. Die gefundene Menge Aetherschwefelsäure zeigt jedoch, dass ein Theil des gegebenen Indols als andere Verbindungen ausgeschieden waren. Die aus dem gegebenen Indol berechnete Menge Aetherschwefelsäure ist nämlich grösser als was in dem Harn nachgewiesen worden war.

1. Versuch (3 Tage).

Gepaarte Schwefelsäure während der Indolfütterung	3,411 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure in der Vorperiode = 0,133 g BaSO ₄ pro Tag, also für 3 Tage	0,399 „ „
Ueberschuss der gepaarten Schwefelsäure	3,012 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure, welche der Menge des zugeführten Indols (2,5 g) entspricht	4,9698 „ „
Differenz	1,9578 = 39,4%

2. Versuch (2 Tage).

Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen während der Indolfütterung	1,412 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen im normalen Harn	0,316 „ „
Ueberschuss der gepaarten Schwefelsäure	1,096 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure, welche der zugeführten Indolmenge von 0,75 g entspricht	1,4909 „ „
Differenz	0,3949 g = 26,5%

3. Versuch (2 Tage).

Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen während der Indolfütterung	1,401 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen im normalen Harn	0,250 „ „
Ueberschuss der gepaarten Schwefelsäure	1,151 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure, welche der zugeführten Indolmenge von 0,75 g entspricht	1,4909 „ „
Differenz	0,3399 g = 22,8%

4. Versuch (2 Tage).

Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen während der Indolfütterung	1,507 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen im normalen Harn	0,334 „ „
Ueberschuss der gepaarten Schwefelsäure	1,173 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure, welche der zugeführten Indolmenge von 0,75 g entspricht	1,4909 „ „
Differenz	0,3179 g = 21,3%

5. Versuch (2 Tage).

Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen während der Indolfütterung	0,815 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure von 2 Tagen im normalen Harn	0,270 „ „
Ueberschuss der gepaarten Schwefelsäure	0,545 g BaSO ₄
Gepaarte Schwefelsäure, welche der zugeführten Indolmenge von 0,35 g entspricht	0,6958 „ „
Differenz	0,1508 g = 21,7%

Man sieht also, dass die geringste procentische Ausscheidung von Aetherschwefelsäuren der grössten Zufuhr von Indol entspricht, was auch mit der Beobachtung gut übereinstimmt, dass eben in diesem Falle die spontane Abspaltung von Indigo am reichlichsten war.

Als Vergleich lässt sich anführen, dass Baumann¹⁾ nach Fütterung mit 0,9 g Indol, 68,6% (d. i. eine Differenz von 31,4%) als Aetherschwefelsäure wiedergefunden hat.

Die früheren Untersuchungen über Indigoproduktion nach Indolfütterung sind mit der quantitativen Methode von Jaffe²⁾ ausgeführt worden, und wird nach dieser Methode Chlorkalklösung als Oxydationsmittel gebraucht, und der gebildete Indigo schliesslich gewogen. Diese Methode ist sehr umständlich und die Oxydation mit Chlorkalk sehr schwierig, weil der Zusatz einer zu reichlichen Menge Verlust von Indigo verursacht, indem ein Theil Indigo zu Isatin oxydirt wird; eine zu kleine Menge des Oxydationsmittels wird nicht im Stande sein, eine vollständige Oxydation des Indoxyls zu bewirken. — Die gefundenen Werthe sind auch ziemlich schwankend,³⁾ und man muss ja von vornherein erwarten, dass dieselben zu gering sind.

1) Baumann: Zur Kenntniss der aromatischen Substanzen des Thierkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. I. 1877/78, S. 67.

2) Jaffe: Ueber den Nachweis und die quantitative Bestimmung des Indicans im Harn. Arch. für die gesammte Physiologie, Bd. III, 1870, S. 458.

3) Siehe S. 557.

Bei Berechnung der ausgeschiedenen Indigomenge wird man in meinen Versuchen finden, dass dieselbe etwa der Hälfte von der zugeführten Indolmenge entspricht.

1. Versuch (2,5 g Indol).

Indigo von 3 Tagen während der Indolfütterung	1,3777 g
Indigo von 3 Tagen in normalem Harn	0,0342 »
Ueberschuss des Indigos	1,3435 g
Indigo, welcher dem zugeführten Indol entspricht	2,8 » ¹⁾
Von der berechneten Menge ist also 47,98% gefunden.	

2. Versuch (0,75 g Indol).

Indigo von 2 Tagen während der Indolfütterung	0,4145 g
Indigo von 2 Tagen in normalem Harn	0,0264 »
Ueberschuss des Indigos	0,3881 g
Indigo, welcher dem zugeführten Indol entspricht	0,84 »
Von der berechneten Menge ist also 46,20% gefunden.	

3. Versuch (0,75 g Indol).

Indigo von 2 Tagen während der Indolfütterung	0,4029 g
Indigo von 2 Tagen in normalem Harn	0,0184 »
Ueberschuss des Indigos	0,3845 g
Indigo, welcher dem zugeführten Indol entspricht	0,84 »
Von der berechneten Menge ist also 45,77% gefunden.	

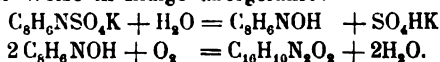
4. Versuch (0,75 g Indol).

Indigo von 2 Tagen während der Indolfütterung	0,4074 gr.
Indigo von 2 Tagen in normalem Harn	0,0292 »
Ueberschuss des Indigos	0,3782 gr.
Indigo, welcher dem zugeführten Indol entspricht	0,84 »
Von der berechneten Menge ist also 45,02% gefunden.	

5. Versuch (0,35 g Indol).

Indigo von 2 Tagen während der Indolfütterung	0,1921 gr.
Indigo von 2 Tagen in normalem Harn	0,0184 »
Ueberschuss des Indigos	0,1737 gr.
Indigo, welcher dem zugeführten Indol entspricht	0,392 »
Von der berechneten Menge ist also 44,31% gefunden.	

¹⁾ Nach Baumann und Brieger wird indoxylschwefelsaures Kalium folgender Weise in Indigo übergeführt:



Die Indigoausscheidung bei diesem Hunde ist also sehr constant und die procentische Menge zeigt sich unabhängig von dem gegebenen Quantum. Die Indigomenge ist aber nicht so gross wie die der Aetherschwefelsäuren, selbst wenn man die ganze Indigomenge als indoxylschwefelsaures Kalium betrachtet, was jedenfalls nicht richtig ist, indem auch eine andere indigo-bildende Substanz, welche aber keine Schwefelsäure abspaltet, vorhanden ist.

Ausser Indoxyl ist es also auch nothwendig, eine Bildung von anderen Oxydationsprodukten, welche kein Indigo liefern, sondern sich als gepaarte Schwefelsäure ausscheiden, anzunehmen.

Vollständig analoge Verhältnisse sind bei der Phenol-ausscheidung beobachtet worden. Tauber¹⁾ und Auerbach²⁾ haben etwa 30—60% des gegebenen Phenols im Harn wiedergefunden. Schaffer³⁾ erhielt dasselbe Resultat, zugleich wurden Aetherschwefelsäure-Bestimmungen ausgeführt, und die Menge dieser Säure war viel grösser als dem ausgeschiedenen Phenol entspricht. Schmiedeberg⁴⁾ hat später gezeigt, dass die Ausscheidung von Aetherschwefelsäuren in dem Falle Schaffer's vollständig mit dem gegebenen Phenol übereinstimmt. Baumann und Preusse⁵⁾ haben gezeigt, dass die Benzolfütterung Ausscheidung von Dioxybenzolen (Hydrochinon und Brenzkatechin) bewirken, und die letzteren kommen in Verbindung mit Schwefelsäure vor.

In ähnlicher Weise kann man sich also denken, dass sich

1) Tauber, Beiträge zur Kenntniss über das Verhalten des Phenols im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. II, 1878, 79, S. 368.

2) Auerbach, Zur Kenntniss der Oxydationsprocesse im Thierkörper. Arch. f. pathol. Anatomie, Bd. LXXVII, 1879, S. 231.

3) Schaffer, Ueber die Ausscheidung des dem Thierkörper zugeführten Phenols. Journal f. pract. Chemie, Bd. XVIII, 1878, S. 282.

4) Schmiedeberg, Ueber Oxydationen und Synthesen im Thierkörper. Arch. f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XIV, 1881, S. 310.

5) Baumann und Preusse, Zur Kenntniss der Oxydation und Synthese im Thierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. III, 1879, S. 156.

neben Indoxyl auch andere Oxydationsprodukte bilden, wie Oxindol, Dioxindol und Isatin; diese werden nicht als indigo-bildende Substanzen ausgeschieden (Masson,¹⁾ Niggeler²⁾. Darüber dass sie (oder jedenfalls Isatin) aber eine Vermehrung der Aetherschwefelsäuren bewirken, habe ich mich durch Selbstversuche überzeugt.

Nach 2,0 g Isatin mit 4 Portionen à 0,50 g im Laufe von 1½ Stunden genommen, zeigte die Aetherschwefelsäuremenge eine Steigerung von 0,7728 g BaSO₄ bis 1,4339 g, den folgenden Tag war es wieder 0,7583 gr. BaSO₄. Die Indigoausscheidung an denselben Tagen zeigte 5,8, 5,6 und 7,8 mg.

Aus diesen Untersuchungen geht also hervor:

1. Dass Indol vom Darinkanal innerhalb 24 Stunden durch den Harn ausgeschieden wird.
2. Dass 1,0 g Indol deutliche Vergiftungssymptome bei einem mittelgrossen Hunde hervorzubringen im Stande ist.
3. Dass eine geringere Menge Aetherschwefelsäure, als dem gegebenen Indol entspricht, ausgeschieden wird.
4. Dass etwa die Hälfte von dem gegebenen Indol als indigobildende Substanz ausgeschieden wird.
5. Dass neben indoxylschwefelsaurem Kalium auch andere gepaarte Schwefelsäuren gebildet werden.
6. Dass die Indigoausscheidung unter normalen Verhältnissen bei gleichmässiger Nahrung keine constante Grösse bildet.
7. Dass die Aetherschwefelsäuren unter letzterwähnten Verhältnissen auch durchaus nicht immer eine fast constante Grösse bilden.
8. Dass es kein constantes Verhältniss zwischen Indican und Aetherschwefelsäure gibt.
9. Dass Kochen der Nahrung ohne Einfluss auf Indican und Schwefelsäureausscheidung ist.

1) Masson, Des Matières colorantes du Groupe Indigo etc. Arch. de Physiologie norm. et pathol. Bd. 2 I, 1874, S. 961.

2) Niggeler, Ueber Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe. Arch. f. experiment. Pathologie und Pharmakologie, Bd. III, 1875, S. 70.

Längere Zeit nachdem diese Untersuchungen beendet waren, hat es sich gezeigt, dass die Indigobestimmungen nach einer Methode ausgeführt sind, welche nicht immer brauchbar ist, warum ich die Methode später modificirt habe.¹⁾

Diese Modification scheint jedoch ohne Bedeutung zu sein, wenn es sich um Hunde handelt, die eine Nahrung bekommen, wie die in meinem Versuche war. Fremde Bestandtheile, welche störend auf die Titrirung einwirken, kommen nämlich unter diesen Umständen kaum in Betracht. Um den möglichen Fehler zu finden, habe ich Kontrollversuche mit zwei Hunden ausgeführt, welche mir von Herrn Prof. S. Torup in dem physiologischen Institut der Universität gütigst zu meiner Disposition überliefert wurden. Die Thiere bekamen 450 g Fleisch, 50 g Fett und 150 g Reis pro Tag.

Die Indicanbestimmungen wurden täglich ausgeführt und zwar mit Parallelbestimmungen nach meiner ersten und meiner modificirten Methode. Das Resultat war wie folgt:

Versuch I.

Versuch II.

Datum	Harn- menge	Alte Methode	Modific. Methode	Datum	Harn- menge	Alte Methode	Modific. Methode
1899				1899			
6. I.	230	1,33 mg	0,78 mg	25. I.	680	5,74 mg	3,71 mg
8.	780	7,70 »	5,06 »	26.	1240	10,08 »	7,45 »
9.	760	2,34 »	2,11 »	27.	1370	14,01 »	9,83 »
10.	600	2,85 »	2,26 »	28.	1100	21,75 »	17,25 »
11.	650	2,73 »	2,54 »	29.	1030	20,90 »	18,00 »
12.	600	0,82 »	0,82 »	30.	1470	25,32 »	23,41 »
13.	800	2,85 »	2,89 »	31.	600	8,22 »	8,02 »
				1. II.	880	30,89 »	29,12 »
				2.	1140	13,71 »	12,23 »
				3.	220	10,13 »	9,11 »

Die beiden Hunde waren vor der Untersuchung mit gemischten Abfällen gefüttert. Am Anfang beider Perioden gibt meine ursprüngliche Methode Werthe, die etwas zu hoch

¹⁾ Wang, Weiteres über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, 1899, S. 135.

sind. Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren nimmt doch allmählich ab, sodass die Differenz, welche sich in dem einen Falle ergibt, zu klein ist, um den Resultaten gegenüber, welche meine Fütterungsversuche mit Indol gegeben haben, eine Rolle spielen zu können.

Ich werde schliesslich auch diese Gelegenheit benutzen, Herrn Prof. E. Salkowski sowohl für das Interesse, womit er meiner Arbeit gefolgt ist, als auch für die freundliche Ueberlassung des Untersuchungsmaterials herzlichst zu danken.

Kristiania, den 9. Mai 1899.

Ueber die Krystallformen der Albumine.

Von
Arthur Wichmann.

Mit vier Abbildungen.

(Der Redaction zugegangen am 9. Juni 1899.)

Nachdem die mannigfachen Versuche, das Eieralbumin in krystallisirter Form zu erhalten, schliesslich von Erfolg begleitet gewesen waren, gelang es weiteren Untersuchungen, die zuerst angewandte Methode zu vervollkommen und weiter auszubauen. Im Laufe der letzten Jahre ist jedoch das Ovalbumin mehr in den Hintergrund getreten, und das Interesse hat sich vorwiegend den Krystallbildungen des Serumalbumins zugewandt. Hinsichtlich der Deutung der verschiedenen Formen ist indessen noch keine Uebereinstimmung erzielt worden. Krystalle des Lactalbumins sind bisher überhaupt nicht zur Darstellung gelangt.

Durch meinen Collegen C. A. Pekelharing, dem ich ein reiches Material verschiedener Albuminkrystalle verdanke, bin ich zu einem erneuten Studium der ganzen Frage angeregt worden, und sollen dementsprechend die morphologischen und physikalischen Eigenschaften dieser Substanzen in den nachfolgenden Zeilen im Zusammenhange erörtert werden.

Alle übrigen krystallisirten Eiweisskörper — pflanzliche wie thierische — sind ausser Betracht gelassen worden, da die Unterschiede sowohl in Bezug auf ihre Krystallformen, als auch hinsichtlich anderer Eigenschaften doch zu erhebliche

sind, um ohne Weiteres in dieser Hinsicht verwandtschaftliche Beziehungen zu den Albuminen feststellen zu können.¹⁾

Krystallisirte Albumine sind bisher fast ausschliesslich durch Zusatz einer Lösung des neutralen Ammoniumsulfates erhalten worden, ohne dass dieses Salz dabei in nachweisbaren Mengen in dieselben eintritt. Vielmehr lässt sich aus dem Gesamtverhalten nur der Schluss ziehen, dass das schwefelsaure Ammon bei dem Krystallisationsprocess lediglich die Rolle eines «agent minéralisateur» spielt. E. Harnack hat allerdings geglaubt, wirkliche Verbindungen des Eialbumins mit dem Ammoniumsulfat erhalten zu haben, die indessen — wie selbst zugegeben wird — sehr eiweissarm sind (etwa 5%).²⁾ Sowohl F. Hofmeister³⁾ als S. Gabriel⁴⁾ haben die Richtigkeit dieser Angabe, zum Theil bereits aus theoretischen Gründen, in Zweifel gezogen.

Es lässt sich nun thatsächlich der Nachweis führen, dass Harnack in einem Irrthume befangen war. Das Ammoniumsulfat zeigt nämlich eine lebhafte Neigung, während des Krystallisationsprocesses Partikelchen der Mutterlauge einzuschliessen. Bringt man daher einen Tropfen einer reinen, wässerigen Lösung auf den Objectträger, so gewahrt man nach dem Verdunsten in den ausgeschiedenen Kryställchen unter dem Mikroskop zahlreiche Flüssigkeitseinschlüsse, die sehr häufig die Formen des Wirthes besitzen und meistens mit einer Libelle versehen sind. Auch Gaseinschlüsse stellen sich zuweilen ein. Fügt man der Salzlösung Fuchsin oder einen anderen Farbstoff hinzu,

1) A. F. W. Schimper, Ueber die Krystallisation der eiweissartigen Substanzen. Zeitschr. f. Krystallogr., Bd. V, Leipzig 1881, S. 131—168.

Neuere Litteratur bei L. Maillard. La cristallisation des matières albuminoïdes et les cristalloïdes protéiques de la micrographie. Revue générale des sciences pures et appl., T. IX, Paris 1898, p. 608.

2) Studien über das sogenannte aschefreie Albumin. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXIII, 2. Berlin 1890, S. 3745.

3) Ueber die Zusammensetzung des krystallinischen Eialbumins, diese Zeitschr., Bd. XVI, 1892, S. 188.

4) Bemerkungen über Hofmeister's krystallinisches Eialbumin, diese Zeitschr., Bd. XV, 1891, S. 462.

so bleibt die Substanz der sich ausscheidenden Krystalle völlig farblos, die eingeschlossenen Partikel der Mutterlauge erscheinen dagegen lebhaft gefärbt.

In ganz ähnlicher Weise wiederholt sich die Erscheinung, wenn man eine kleine Probe des in einer Ammoniumsulfatlösung suspendierten Breies von Albuminkryställchen — gleichgültig ob von Serum oder Eieralbumin — auf den Objectträger bringt. In Folge des Verdunstens scheiden sich zunächst Täfelchen und Säulen des schwefelsauren Ammons aus, die krystallographisch wohl begrenzt erscheinen. Mit dem völligen Eintrocknen gelangt eine zweite Generation zur Ausscheidung, die aus kleinen, aneinander gereihten, häufig trichitisch gekrümmten Nadeln besteht. Das zwischengeklemmte, nunmehr amorph gewordene Albumin stellt gleichsam einen Grundteig dar. Das Präparat bietet somit das typische Bild der Intersertal- oder Ophitstructur, die in diesem Falle dadurch zu Stande kommt, dass der erstarrende und widerstandsfähiger werdende Albuminbrei das Ausscheiden wohl ausgebildeter Krystalle verhindert. Behufs Ueberwindung



Fig. 1.

dieses Widerstandes ist denn auch das Ammoniumsulfat gezwungen, die Nadel- und Trichitenform zu wählen. (Fig. 1.)¹⁾

Bereits bei Anwendung schwacher Vergrößerungen gewahrt man, dass die erste Generation zahlreiche Interpositionen enthält, und zwar neben Einschlüssen von Flüssigkeit auch solche von amorph gewordenem Albumin. Hieraus ergibt sich,

1) Aus reiner Lösung entstehen nur Formen, welche denen der ersten Generation entsprechen. Die zwischen denselben befindlichen Räume bleiben leer.

dass die « schön krystallisirten Verbindungen des Albumins mit schwefelsaurem Ammon in gut ausgebildeten Tafeln und Säulen », die Harnack erhalten zu haben geglaubt hatte, nichts Anderes darstellen, als Krystalle des Ammoniumsulfats, denen Partikelchen des Albumins eingelagert sind.

In Anbetracht des Umstandes, dass bei der Untersuchung von Albuminen so häufig Krystallbildungen des Ammoniumsulfats zur Beobachtung gelangen und alsdann leicht zu Verwechslungen Anlass geben können, möge es gestattet sein, die Krystallformen dieses Salzes, so wie dieselben sich unter dem Mikroskop offenbaren, kurz zu beschreiben.

Die auf dem Objectträger sich ausscheidenden Individuen stellen in der Regel Täfelchen von rechteckiger Form dar. Dieselbe wird bedingt durch das Vorherrschen des Makropinakoid $\infty \bar{P}\infty$ (100), welches auch den säulenförmig ausgebildeten Kryställchen niemals fehlt. Neben den Prismenflächen erscheinen auch diejenigen des Makrodoma sehr häufig, während Pyramidenflächen seltener auftreten und dann zuweilen ungleichmässig entwickelt sind, sodass die Individuen einen monoklinen Habitus zur Schau tragen. Typisch für die mikroskopischen Gestalten ist die von V. v. Lang gegebene Abbildung.¹⁾

In Uebereinstimmung mit den Anforderungen des rhombischen Systems an die optischen Eigenschaften zeigen die Kryställchen zwischen gekreuzten Nicols stets Auslöschung, sobald eine Prismenkante mit dem Nicolhauptschnitte coincidirt oder senkrecht dazu steht. Der Charakter der Doppelbrechung ist ein positiver. Bei Anwendung convergenten polarisirten Lichtes gelangen Axenbilder nicht zur Beobachtung, da das Makropinakoid $\infty \bar{P}\infty$ (100), mit dessen Fläche die Krystalle dem Objectglase aufliegen, Ebene der optischen Axen ist ($a=b$ ist die optische Normale).²⁾ Da $\gamma - \alpha = 0,0121$, so ist erst bei einer

¹⁾ Untersuchungen über die physikalischen Verhältnisse krystallisirter Körper. Sitzgsber. k. Acad. d. W. Wien. Math. naturw. Cl. XXXI. 1858, S. 96, Taf. II, Fig. 8.

²⁾ A. Des Cloizeaux, Nouvelles recherches sur les propriétés optiques des cristaux naturels et artificiels. Mém. prés. par div. savants à l'Inst. de France. XIII. Paris 1867, p. 96.

Dicke von 0,0412 mm. das Roth erster Ordnung im polarisirten Lichte zu gewahren. Bei der Einbettung der Kryställchen in Canadabalsam erscheinen ihre Ränder als zarte Linien, da der mittlere Brechungsexponent $\frac{\alpha + \beta + \gamma}{3} = 1,5264^1)$ nur wenig von dem des Einschlussmittels abweicht.

Indem wir nunmehr zu einer Besprechung der Krystallformen der Albumine übergehen, sollen zunächst diejenigen des Eieralbumins gesondert von denjenigen des Serumalbumins, und daran anschliessend die Gestalten des Lactalbumins, betrachtet werden. Am Schlusse wird sich die Gelegenheit darbieten, die Eigenschaften der genannten Eiweisskörper mit einander zu vergleichen.

1. Eieralbumin.

F. Hofmeister hat zuerst den Weg gewiesen, auf welchem das krystallisirte Albumin erhalten werden kann.²⁾ Nachdem das aus dem geschlagenen Hühnereiweiss, unter Zusatz von Ammonsulfat, sich ausscheidende Globulin abfiltrirt worden ist, setzt man das Filtrat dem Verdunsten aus, worauf das Albumin im amorphen Zustande zum Absatz gelangt, indem sich ausschliesslich Globuliten bilden. Durch wiederholtes Auflösen in halbgesättigter Lösung des schwefelsauren Ammons gelang es endlich, während des Verdunstenlassens die grösste, wenn nicht gar die gesammte Menge des Albumins in Gestalt sphaerolithischer Aggregate zarter Nadelchen zu erhalten. Auch isolirte Nadelchen und schiefwinklige dünne Plättchen wurden beobachtet. S. Gabriel konnte die vorstehenden Mittheilungen ergänzen und zugleich darthun, dass man auf einem einfacheren Wege bereits im Stande ist, Krystallformen zu erzeugen.³⁾

1) Bestimmungen der Hauptbrechungsexponenten des Ammoniumsulfates hat man M. Erofjeff zu verdanken. (Sitzgsber. Akad. Wien. Math. naturw. Cl. LV. 2. Abthlg. 1867, S. 543.)

2) Ueber die Darstellung von krystallisirtem Eieralbumin und die Krystallisirbarkeit colloider Stoffe: diese Zeitschrift Bd. XIV, 1890, S. 166.

3) Bemerkungen über Hofmeister's krystallinisches Eieralbumin; diese Zeitschrift, Bd. XV, 1890, S. 457.

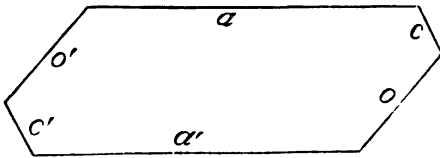
Einige Jahre später veröffentlichten St. Bondzyński und L. Zoja die Resultate ihrer Untersuchungen über diesen Gegenstand.¹⁾ Es gelang diesen Forschern relativ grosse Individuen mittelst fractionirter Krystallisation zu erhalten. Dieselben wurden von E. Artini folgendermassen beschrieben:

« Es sind Täfelchen, deren Flächen höchstens 6 Seiten besitzen. Die Seiten c und c' fehlen manchmal. Die Messung der Supplementzirkel ergab:

$$\text{für } a \wedge c = 71^\circ$$

$$\text{» } a \wedge o = 67^\circ$$

$$\text{» } o \wedge a' = 42^\circ.$$



Im polarisirten Lichte, bei gekreuzten Nicols untersucht, zeigen sie keine merkliche Doppelbrechung. Es ist anzu-

nehmen, dass es sich um Krystalle des monoklinischen oder triklinischen Systems handelt.»

Angaben über die Darstellung reinerer krystallisirter Produkte hat man Panormoff zu verdanken, doch unterblieb dabei eine Beschreibung der erzeugten Formen.²⁾

Endlich haben sich noch F. Gowland Hopkins und S. N. Pinkus mit diesem Körper beschäftigt. Es gelang ihnen, durch Zusatz von verdünnter Essigsäure zu dem mit Ammoniumsulfatlösung versetzten Eiweiss einen völlig krystallinischen Niederschlag, aus Aggregaten von Nadeln bestehend, zu erhalten, ohne dass noch Spuren amorpher Substanz vorgefunden wurden.³⁾ Wie sich aus dem Hinweise auf die in dem Werke

1) Ueber fractionirte Krystallisation des Eialbumins; diese Zeitschrift, Bd. XIX, 1894, S. 5.

2) Sur la composition de l'albumine de l'œuf de poule. Bull. Soc. chim. de Paris (3) XVIII. 1897, p. 595. (Auszug aus Journ. de la Soc. physico-chimique russe XXVIII, p. 614.)

3) Observations on the crystallisation of Animal Proteids. Journ. of Physiology XXIII. London 1898, p. 132.

von E. A. Schäfer gegebene Abbildung ergibt,¹⁾ beschränkte sich die Darstellung auf sphärolithische Aggregate, wie sie in ähnlicher Gestalt, wenn auch vielleicht von geringerer Grösse, bereits von Hofmeister beschrieben worden waren.

Ich gehe nunmehr dazu über, zunächst die an den Hofmeister'schen Sphärolithen angestellten Beobachtungen mitzutheilen. Die strahligen Aggregate erweisen sich unter dem Mikroskope aus stark lichtbrechenden, farblosen, oft zugespitzten Nadelchen zusammengesetzt. Ein schwacher Druck auf dem Deckglase genügt, um die ausserordentlich weiche Masse zur Zertheilung zu bringen. Die Länge der Nadelchen konnte zu 0,01—0,021 mm. gemessen werden, während die Dicke höchstens 0,0015 mm. beträgt. Bis zu ihrer Zerstörung durch Schimmelbildung, nach Ablauf eines halben Jahres, blieben die Formen durchaus unverändert. Die Doppelbrechung dieser Nadelchen ist eine so ausserordentlich schwache, dass dieselbe nur ausnahmsweise wahrgenommen werden kann. Das charakteristische Kreuz der Sphärolithe, wie sich dasselbe zwischen + Nicols offenbaren muss, wurde denn auch niemals beobachtet.

Da diese Gebilde sich zur Bestimmung der Krystallgestalten als gänzlich unzureichend erwiesen hatten, ging Herr Pekelharing dazu über, sich der von Hopkins und Pinkus vorgeschlagenen Methode zu bedienen. Auf diesem Wege gelang es denn auch grössere und wohlbegrenzte Individuen und zwar sowohl aus frischem Hühnereiweiss, als aus dem Eiweiss des Handels zu gewinnen. Die aus der letzterwähnten Substanz erhaltenen Kryställchen waren vorherrschend von spiessiger Gestalt (Fig. 2a), anscheinend hemimorph, indem eine spitze Pyramide an der Unterseite von einer Basisfläche begrenzt erscheint. Daneben bemerkt man auch rectanguläre Leisten von 0,01—0,03 mm. Länge und bis zu 0,006 mm. Breite. Die Individuen sind farblos und löschen zwischen + Nicols parallel und senkrecht zur Basis aus. Die Interferenzfarben bewegen sich zwischen dem Eisengrau und Lavendel-

1) Text-Book of Physiology I, Edinburgh & London, 1894, p. 44.

grau erster Ordnung. Der Charakter der Doppelbrechung ist ein positiver.

Weit grössere Krystalle konnten aus dem frischen Eiweiss gezüchtet werden. Die scharf begrenzten sechsseitigen Säulen, neben denen noch zahlreiche zarte Nadelchen auftraten, erreichten eine Länge von 0,1—0,15 mm. und eine Dicke von 0,003—0,021 mm. Der hemimorphe Charakter gelangte bei ihnen nicht in deutlicher Weise zum Ausdruck, da an den beiderseitigen Enden in der Regel nur die Basis als Begrenzungsfläche auftrat und Zuschärfungen durch eine Pyramidenfläche seltener zu gewahren sind. Die optischen Eigenschaften erwiesen sich als völlig mit dem vorigen Präparate übereinstimmende. $\gamma - \alpha$ konnte annähernd zu 0,0016 bestimmt werden. Durch Umkrystallisiren gelangten noch einige andere

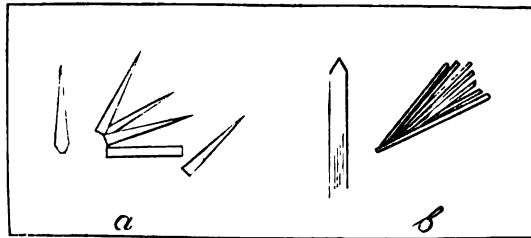


Fig. 2.

Formen zur Beobachtung, die ebenfalls einen prismatischen Habitus zur Schau trugen, indessen deutlich hemimorph waren, indem an dem einen Ende eine Pyramide auftrat, während an dem entgegengesetzten sich der Krystall in einzelne Nadelchen gleichsam auflöste (Fig. 2b). Zugleich mit diesen Formen gelangten auch langgestreckte Nadeln und strahlige Aggregate derselben zur Entwicklung.

Die im Vorstehenden mitgetheilten Beobachtungen stehen im Widerspruch mit den von Bondzyński und Zoja gemachten Angaben. Eine Schwerlöslichkeit der Albuminkrystalle in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung habe ich ebensowenig zu beobachten vermocht, wie die von Artini beschriebenen und abgebildeten Krystallformen. Gegenüber der Bemerkung, dass ein Präparat, welches nur «Eiweisskugeln» enthielt, inner-

halb dreier Tage als zum grössten Theile aus Krystallen bestehend sich erwies, muss ich hervorheben, dass nach meinen Erfahrungen die im Laufe eines vollen Tages zur Ausscheidung gelangten Individuen sich durch grosse Beständigkeit hinsichtlich ihrer Form und Grösse auszeichnen. Ob sich in dem erwähnten Falle nicht etwa Krystalle des schwefelsauren Ammons gebildet hatten, bin ich ausser Stande zu entscheiden.

Eine bekannte Eigenschaft der Albumine ist, dass dieselben begierig Farbstoffe an sich reissen. Durch Zusatz von Säurefuchsin, Eosin, Carmin, Methylenblau u. s. w. erhält man schöne Färbungen und der Vorgang ist ein so lebhafter, dass der Farbstoff, falls nicht im Ueberschuss hinzugefügt, von den Albuminkrystallen völlig an sich gerissen wird. Die überstehende Ammoniumsulfatlösung wird dann wieder farblos. Eine derartige Erscheinung hat O. Lehmann bereits bei Krystallen organischer Verbindungen allgemein verbreitet gefunden.¹⁾ Das Tinctionsmittel haftet sehr fest und ist nicht leicht wieder auszuziehen.

Unter dem Mikroskop lassen die gefärbten Kryställchen nicht allein nicht die geringste Aenderung ihrer Formen wahrnehmen, sondern heben sich im Gegentheil mit grösserer Schärfe als bisher von der umgebenden Flüssigkeit ab. Der Farbstoff befindet sich in ihnen in diluter, gänzlich gleichmässiger Vertheilung, so dass dickere Individuen intensiver gefärbt erscheinen, als dünnere. Während die letztgenannten überhaupt keinen Pleochroismus erkennen lassen, ist derselbe auch an den grösseren Krystallen nur ein ganz ausserordentlich schwacher. Im Uebrigen wird aber durch die Färbung keine Aenderung der optischen Eigenschaften bewirkt. Auf Grund des Gesamtverhaltens gelangt man zu dem Schluss, dass die verschiedenen Farbstoffe keine chemische Verbindung mit dem Albumin eingehen, sondern dass man sich, in Uebereinstimmung mit der von O. Lehmann geäusserten Ansicht, den Vorgang so vorzustellen hat, dass der Farbstoff zwischen den Molekeln ab-

¹⁾ Ueber künstliche Färbung von Krystallen und amorphen Körpern. Wiedemann's Annalen LI. 1894, S. 52.

gelagert wird.¹⁾ Selbst wenn die von E. Middeldorf den Albuminmolekeln zugeschriebene, geradezu ungeheure Grösse²⁾ sich als eine übertriebene herausstellen sollte, so unterliegt es doch kaum einem Zweifel, dass dieselbe eine recht beträchtliche ist. Gegenüber der Thatsache, dass die aus reiner Lösung ausgeschiedenen Albuminkrystalle nach dem Eintrocknen sofort zerfallen, steht die andere, dass die Krystalle, sobald dieselben einen Farbstoff oder auch andere Substanzen in sich aufgenommen haben, nach dem Eintrocknen ihre Gestalt zu erhalten wissen, wenngleich ihre Substanz amorph geworden ist. Man geht wohl in der Annahme nicht fehl, dass die erwähnten Stoffe durch ihre Einlagerung zwischen den Molekeln gleichsam ein festes Gerüst bilden, das die Form des zerfallenden Albumins zu erhalten im Stande ist. Es gibt kaum eine krystallisirte Substanz, die in so ausgedehntem Maasse, einem Schwamme gleich, fremde Substanzen in gelöstem Zustande in sich aufnimmt, wie das Albumin. Die Zahl ihrer Verbindungen würde sich bis ins Ungemessene steigern, wollte man bei einem derartigen Vorgange jederzeit die Bildung chemischer Verbindungen annehmen. Die erwähnten Verhältnisse mögen durch einige Beispiele erläutert werden. Werden dem Krystallbrei einige Tropfen einer Goldchloridlösung hinzugefügt, so färben sich die Albumin-Individuen sofort intensiv gelb. Nach dem Eintrocknen bleiben sie anscheinend völlig unverändert, doch ist ihre Substanz amorph geworden. Bei der Behandlung mit Silbernitrat bleiben die Krystalle ebenfalls erhalten. Der Nachweis, dass sie das genannte Salz in sich aufgenommen haben, kann dadurch leicht geführt werden, dass die Individuen unter dem Einfluss des Lichtes eine braune Färbung annehmen. Noch charakteristischer war ein mit einer Flüssigkeit von hohem spec. Gewichte (3,3), nämlich dem Cadmiumborowolframat, angestellter Versuch. Wurde dieselbe dem Krystallbrei des

¹⁾ l. c. S. 62.

²⁾ Ueber den Schwefel der Serum-Albumin-Krystalle und deren Verdauungsprodukte. Verhandl. phys. med. Gesellsch. N. F. XXXI. 1897. Würzburg 1898, S. 428.

Albumins hinzugefügt, so trieb derselbe zunächst auf der Oberfläche. Mässiges Schütteln oder Umrühren mittelst eines Glasstabes erwies sich als völlig ausreichend, um eine gleichmässige Mischung zu erzielen. Nach kurzer Ruhezeit setzte sich jedoch die gesammte Krystallmasse an dem Boden des Gefässes ab, ein unumstösslicher Beweis dafür, dass die Individuen das Cadmiumsalz aufgesogen hatten, und zwar in concentrirter Form, denn sonst hätten dieselben noch immer nicht zu Boden zu sinken vermocht. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop erwiesen sich die farblosen Kryställchen hinsichtlich ihrer Formen unverändert, im Uebrigen waren sie stärker lichtbrechend geworden, da das aufgenommene Cadmiumborowolframat einen hohen Brechungsexponenten, nämlich 1,7, besitzt. Nach dem Verdunsten der Lösung blieben die Gestalten des Albumins vollständig erhalten.

Auch Säuren, die im Stande sind, aus Albuminlösungen einen amorphen Niederschlag zu erzeugen, wissen den Albumin-krystallen nichts anzuhaben. Behandelt man die letztgenannten z. B. mit Pikrinsäure oder mit Chromsäure, so werden sie intensiv gelb gefärbt, während die Krystallformen, sowie die optischen Eigenschaften keine Aenderung erkennen lassen. Nach dem Eintrocknen bleiben die Gestalten auch noch erhalten, die jedoch durch Hinzufügen eines Tropfen Wassers sofort zerstört werden unter Abscheidung amorphen Albumins.

Noch auffälliger ist das Verhalten des übermangansäuren Kalis.¹⁾ Eine Reihe von Forschern hat die energische Wirkung desselben auf das in Lösung befindliche Albumin studirt. Für unsere Zwecke genügt es, hervorzuheben, dass sofort, unter Bildung einer steifen Gallerte, ein schwarzbrauner,

1) Ausführliche Litteraturangaben bei R. Maly, Untersuchungen über die Oxydation des Eiweisses mittelst Kaliumpermanganat. Sitzungsber. Akad. Wien. XCI, Abth. 2, 1885, S. 157. O. Loew, Ueber Eiweiss und die Oxydation desselben. Journal f. prakt. Chemie. N. F. XXXI, 1885, S. 153. St. Bondzyński und L. Zojka, Ueber die Oxydation der Eiweissstoffe mit Kaliumpermanganat. Diese Zeitschrift Bd. XIX, 1894, S. 225.

voluminöser Niederschlag entsteht. Wird dagegen zu dem Krystallbrei Kaliumpermanganatlösung hinzugefügt, so nimmt derselbe zwar eine lichtkaffeebraune bis schwarzbraune Färbung an, zu einer Gallertbildung kommt es jedoch nicht. Ebenso wenig zeigt die klare, überstehende Flüssigkeit die Reactionen der Oxyprotosulfonsäure. Untersucht man unter dem Mikroskop, so erweisen sich die Krystallformen als gänzlich unversehrt gebliebene. Die einzige wahrnehmbare Veränderung besteht in einer intensiv gelbbraunen bis dunkelbraunen Färbung der Individuen. Lässt man auf dem Objectglase eintrocknen, so bleiben Gestalt und Färbung zunächst unverändert und wird nur die Substanz isotrop, dabei zugleich auch im Wasser unlöslich, so dass sie leicht isolirt und als Präparat dauernd erhalten werden kann. Nach Ablauf weniger Tage tritt bereits Bleichung ein. In allen Fällen, in denen man im Zweifel ist, ob Aluminkrystalle vorliegen, kann diese scharfe und charakteristische Reaction nur anempfohlen werden.¹⁾

Andere Mittel, die Krystallformen des Albumins festzuhalten, sind bereits früher durch Hofmeister und Gürber in Vorschlag gebracht worden.²⁾

Der Erstere behandelte den Krystallbrei mit Alkohol, der Letztgenannte erwärmte denselben in der Mutterlauge. In beiden Fällen hörte die nunmehr wasserunlöslich gewordene Substanz auf krystallinisch zu sein. Uebrigens lässt sich dieselbe in ebenso vortrefflicher Weise tingiren, wie dieses mit dem krystallisirten Albumin der Fall ist.

Mit dem in der Mutterlauge aufbewahrten coagulirten Albumin geht im Laufe mehrerer Wochen eine Veränderung vor sich, indem dasselbe wiederum doppelbrechend wird. Die Individuen löschen alsdann abermals gerade aus, sind nunmehr

1) Genau dieselbe Reaction zeigt übrigens auch das coagulirte Albumin.

2) Den Erfahrungen des Herrn Pekelharing zu Folge, können unveränderte Albuminkrystalle als mikroskopische Dauerpräparate in einer Einbettungsflüssigkeit, die zu $\frac{2}{3}$ aus Glycerin und zu $\frac{1}{3}$ aus concentrirter Ammonsulfatlösung besteht, erhalten werden.

aber optisch negativ geworden. Von einer restitutio in integrum kann umsoweniger die Rede sein, als das Albumin auch jetzt noch in Wasser unlöslich bleibt. Die Doppelbrechung ist eine ausserordentlich schwache, und an den kleineren Individuen überhaupt nicht zu gewahren.

Sobald man das doppelbrechend gewordene Albumin aufs Neue mit der Mutterlauge erwärmt, so wird es wiederum isotrop. Die Krystallformen bleiben dabei in deutlichster Schärfe erhalten, um nach Ablauf von 3 Wochen abermals doppelbrechend zu werden. Die Individuen löschen gerade aus und sind optisch negativ.

2. Serumalbumin.

Der Entdecker des aus dem Serum des Pferdeblutes zur Ausscheidung gelangenden krystallisirten Albumins ist A. Gürber. Während derselbe bei Anwendung der Hofmeister'schen Methode erst im Verlaufe von 3—4 Wochen Aggregate zarter Nadelchen zu erhalten vermochte, gelang es ihm mittelst einer anderen, zunächst nicht beschriebenen Methode, wohlausgebildete Krystalle zu erhalten, und zwar glaubte Gürber drei (später vier) verschiedene krystallisirbare Albumine unterscheiden zu können. Die erste Modification, krystallisirt in hexagonalen Prismen bis zu fast 1 mm. Länge, eine zweite stellt langgestreckte Nadeln mit zugespitzten Enden dar, während die dritte ebenfalls in Gestalt von Nadeln erscheint, deren Enden aber abgestumpft sind. Die letzterwähnten Formen erwiesen sich als «wenig oder nicht doppelbrechend». ¹⁾

In einer zweiten Mittheilung theilte derselbe Forscher einige ergänzende Beobachtungen mit und liess sich, nach ausdrücklicher Anfrage, auch dazu herab einen Zipfel des Schleiers zu lüften, mit dem seine Methode bisher bedeckt worden war. ²⁾ Aber erst in der ausführlichen Abhandlung

¹⁾ Krystallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. der physik. med. Gesellsch. 1894, Würzburg 1895, S. 143.

²⁾ Serumalbuminkrystalle. Sitzungsber. der physik. med. Gesellsch. 1895, Würzburg 1896, S. 26.

von A. Michel wurde derselben eine genaue Beschreibung zu Theil. Das Verfahren beruht, wie bei dem am Eiereiweiss Anwendung findenden, auf der Abscheidung der Albuminkrystalle mittelst Ammoniumsulfatlösung. Dieselbe gelangt jedoch in concentrirter Form und dann noch unter bestimmten Vorsichtsmassregeln zur Verwendung.¹⁾

Die als Fraction I bezeichneten Krystalle, von denen Gürber in der zuletzt erwähnten Arbeit auch eine photographische Abbildung gibt, erreichen eine Länge von über 1 mm. Dieselben erscheinen «auf der einen Seite abgerundet, auf der anderen Seite endigen sie in einer sechsseitigen Pyramide» (Fig. 3a.)

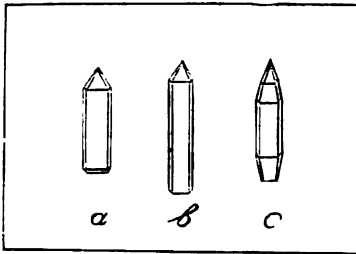


Fig. 3.

Wir haben es hier augenscheinlich mit einer Combination des Protoprismas mit der Protopyramide zu thun, während durch das Hinzutreten von nur einer Basisfläche der hemimorphe Charakter deutlich hervortritt. Auch Zwillingsskrystalle sind zu beobachten, bei denen

die Basis zugleich Zwillingssebene und Zusammensetzungsfläche ist. Maillard hat gelegentlich seiner sorgfältigen Untersuchungen noch eine weitere Combination wahrgenommen (Fig. 3c), an der neben dem Protoprisma zwei Pyramiden auftreten, während das eine Ende abermals durch die Basis eine Abstumpfung erfährt.²⁾ Wie Gürber zuerst hervorgehoben hat, sind die Krystalle positiv doppelbrechend.

Die Krystalle der Fraction II erscheinen weit seltener und dann auch nur in geringer Menge. Ihre Gestalt wird als eine total verschiedene bezeichnet, dagegen die Aehnlichkeit

¹⁾ Zur Kenntniss der Gürber'schen Albuminkrystalle. Mit einem Nachtrage von A. Gürber. Verhandl. der physik. med. Gesellsch., N. F., Bd. XXIX, 1895, Würzburg 1896, S. 117—144.

²⁾ La cristallisation des matières albuminoïdes. Revue générale des sciences pures et appl., T. IX, Paris 1898, S. 610.

mit den Hofmeister'schen Eialbuminkrystallen hervorgehoben. Nach der Abbildung zu urtheilen, besitzen die Individuen Leistenform, die aus der Combination des Prismas mit der Basis resultirt.

Die bei der Fraction III erhaltenen Gebilde stellten lange säulenförmige Nadelchen in hemimorpher Ausbildung dar. An dem einen Ende des Prismas erscheint stets eine Pyramide, während das entgegengesetzte durch eine Basisfläche begrenzt wird.

Als Fraction IV werden endlich Nadeln beschrieben, die jedoch an den beiderseitigen Enden gerade abgestumpft sind.

Auch Maillard hat die verschiedenen Formen, zum Theil nebeneinander auftretend, beobachtet. Die besonders charakteristischen entsprechen der Gürber'schen Fraction I (Fig. 3^c) und II (Fig. 3^b).

Auf Grund der Untersuchung des mir von Herrn Pekelharing zur Verfügung gestellten Materials hege ich nicht den geringsten Zweifel mehr, dass die Gestalten der verschiedenen Modificationen dieses proteusartigen Körpers von einer und derselben Grundform sich ableiten lassen. Die Unterschiede beruhen lediglich auf der abweichenden Grösse und dem Auftreten verschiedener Combinationen.

Sehen wir von den so häufig sich einstellenden zarten Nadeln ab, die zu einer genauen Bestimmung nicht verwendbar sind, so stellt die einfachste Combination das Protoprisma mit der Basis dar. Hiervon lag mir ein Präparat von grosser Reinheit vor, bestehend aus Kryställchen von 0,2 mm. Länge und bis zu 0,006 mm. Breite, die stark lichtbrechend waren. Die Individuen löschen gerade aus und sind optisch positiv.

Eine zweite Modification entspricht genau den von Maillard abgebildeten (Fig. 3^b), sowie den von Gürber als Produkte der Fraction III beschriebenen Kryställchen. Sie unterscheiden sich von den vorhergehenden dadurch, dass die Prismen an dem einen Ende durch eine Pyramide, an dem entgegengesetzten durch die Basis begrenzt werden. Zuweilen tritt die Pyramide an beiden Enden auf. Die längsten Individuen maassen 0,12 mm., die breitesten 0,012 mm.

Die übrigen, von Gürber (Fig. 3^a) und Maillard (Fig. 3^c) beschriebenen Formen entstehen lediglich durch das Hinzutreten einiger weiterer Flächen. Dieselben sind mir durch Autopsie nicht bekannt geworden.

Gürber hat zuerst nachgewiesen, dass die Krystalle sich in vortrefflicher Weise tingiren lassen, ferner, dass dieselben durch Erwärmen in der Mutterlauge unter vollständiger Erhaltung der Form in Wasser unlöslich und zugleich isotrop werden. Ebenso verdankt man ihm die erste Mittheilung, dass diese amorphe Masse nach dreiwöchentlichem Liegen in der Mutterlauge wieder doppelbrechend, aber negativ wird.

Die an den Serumalbuminkrystallen gemachten Wahrnehmungen sind indessen noch nicht ausreichend, dieselben ohne Weiteres einer bestimmten Krystallklasse zuzuweisen, wengleich der Habitus dafür spricht, dass sie der dihexagonalpyramidalen angehören. Ausschlaggebend wäre in dieser Beziehung erst die Untersuchung von Querschnitten im convergenten Licht. Die Herstellung derartiger Objecte muss in Anbetracht der Kleinheit, der Weichheit und Schlüpfrigkeit der Individuen als unthunlich gelten, so dass nach einem anderen Auskunftsmittel Umschau gehalten werden musste.

Da die Albuminlösungen optisch-activ und zwar linksdrehend sind, so lag der Gedanke sehr nahe, dass auch die Krystalle Circularpolarisation aufweisen würden. H. Landolt hat nun dargethan, dass auch Fragmente circularpolarisirender Krystalle, sobald sie in eine Flüssigkeit von gleichem Brechungsexponenten gebracht werden, das gleiche Verhalten zeigen, wie die Krystalle selbst.¹⁾ Sowohl die concentrirte Lösung des Ammoniumsulfats, als das mit dieser gemischte Glycerin besitzen einen weit niedrigeren Brechungsexponenten, als die Albuminkrystalle. Flüssigkeiten, welche die Bedingungen zu erfüllen im Stande wären, sind bis jetzt nicht bekannt und damit

¹⁾ Ueber das Verhalten circularpolarisirender Krystalle im gepulverten Zustande. Sitzungsbericht Akad. Berlin 1896, S. 185; auch Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch. XXIX, 2. Berlin 1896, S. 2404.

ergibt sich die Unmöglichkeit, auf diese Frage zur Zeit eine befriedigende Antwort zu geben.

Nichtsdestoweniger erscheint die Annahme nicht allzu gewagt, dass, ebenso wie die Lösungen, auch die Albumin-krystalle circularpolarisierend sind und dementsprechend würden dieselben der hexagonal-pyramidalen Klasse (Tetartomorphie) zuzuzählen sein.

3. Lactalbumin.

Eingehendere Untersuchungen, die zu einer Darstellung reiner, auch für unsere Zwecke brauchbarer Substanz führten, hat erst J. Sebelien angestellt.¹⁾ Dieses, in Wasser vollkommen lösliche, Lactalbumin zeigte genau dieselben Reactionen, wie das Eier- und das Serumalbumin, indem dasselbe von Natriumsulfat bei einer Temperatur von 30°, von Ammoniumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur ausgefällt werden konnte. Während aber frühere Forscher das Lactalbumin mit dem Serumalbumin identificirt hatten, fand Sebelien, dass die Lösung des ersteren ein erheblich geringeres spezifisches Drehungsvermögen besitzt, als diejenige des letzterwähnten.

Zur Erzeugung von Lactalbuminkrystallen habe ich mich zunächst an die von Sebelien gegebene Vorschrift gehalten und darauf die Lösung nach der von A. Gürber für das Serumalbumin vorgeschriebenen Methode behandelt. Bei den wenigen Versuchen wurden deutliche, wenn auch nur kleine Krystalle erhalten. Vorherrschend stellten sich Prismen in Combination mit der Basis ein, doch fehlten nicht Gestalten, die durch das Auftreten der Pyramide an nur einem Ende einen hemimorphen Charakter zur Schau trugen.

Um nicht in Wiederholungen zu verfallen, möge nur bemerkt werden, dass die optischen Eigenschaften, das Verhalten dieser Krystalle gegenüber Farbstoffen, das Verhalten nach dem Erwärmen u. s. w. sich in jeder Hinsicht mit den-

¹⁾ Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch; diese Zeitschrift IX. 1885, S. 453.

jenigen des Eier- und des Serumalbumins übereinstimmend erwiesen.

4. Zusammenfassung der Resultate.

Nachdem die Stellung des Serumalbumins im Krystallsystem in annähernder Weise festgestellt werden konnte, erhebt sich sofort die Frage: Welcher Krystallklasse gehören die Individuen des Eier-, sowie diejenigen des Lactalbumins an? Die Antwort darauf kann nach dem Vorangegangenen nicht länger zweifelhaft sein. Der Habitus der Krystalle ist der gleiche und der einzige Unterschied besteht darin, dass es bisher weder gelungen ist, aus den Lösungen des Eier- und des Lactalbumins grössere Krystalle noch gewisse Combinationen der Formen zu erhalten. Die optischen Eigenschaften stimmen bei allen diesen Albuminen in jeder Beziehung völlig überein, und in nicht geringerem Maasse ist dies hinsichtlich der chemischen Reactionen der Fall. Sämmtliche bei dem Eialbumin angeführten Erscheinungen wurden auch bei den Krystallen des Serum- und des Lactalbumins geprüft und jedesmal genau das gleiche Resultat erhalten. Im Gegensatze zu Michel und Gürber müssen die von diesen auseinander gehaltenen, verschiedenen Fractionen angehörenden Serumalbumine als durchaus einheitliche Körper aufgefasst werden, deren Gestalten von denselben Grundformen abzuleiten sind.

Giesst man eine Lösung des Serumalbumins mit einer solchen des Ovalbumins zusammen und bewirkt die Krystallisation durch Hinzufügen von Ammoniumsulfatlösung, so scheiden sich zwar kleine, aber völlig gleichartig gestaltete Krystalle aus. Genau derselbe Fall tritt ein, wenn mit einer Mischung der Lösungen aller drei Albumine operirt wird. Daraus ergibt sich, dass die verschiedenen krystallisirbaren Albumine, wenn auch nicht geradezu identisch, so doch jedenfalls unter einander isomorph sind.

Die krystallinische, in Wasser lösliche Modification der Albumine, die auch im amorphen Zustande bekannt ist, möge als α -Albumin bezeichnet werden. Seine chemische Zusammensetzung hat bisher nicht ermittelt werden können, da dasselbe

nicht zu isoliren ist, indem mit dem Eintrocknen sofortiger Zerfall der Krystalle eintritt.¹⁾

Durch Erwärmen in der Mutterlauge oder durch Behandlung mit Alkohol wird das α -Albumin in eine zweite Modification, das β -Albumin, übergeführt, welches amorph und in Wasser unlöslich ist. Im weiteren Gegensatze zum α -Albumin, das monotrop ist, erscheint dasselbe als enantiotrop, indem es innerhalb weniger Wochen negative Doppelbrechung erlangt, um durch abermaliges Erwärmen wiederum isotrop zu werden.

Utrecht, 5. Juni 1899.

¹⁾ Die von Gürber und in weiterer Folge von Michel, sowie von Middeldorf analysirten Substanzen waren — worauf Wislicenus (Sitzgsber. phys. med. Gesellsch. 1895, Würzburg 1896, S. 27) bereits hingewiesen hat — keine Krystalle gewesen, sondern Pseudomorphosen derselben.

Zurechtstellung.

Von

E. Abderhalden.

(Der Redaction zugegangen am 9. Juli 1899.)

In meiner Mittheilung vom 24. Mai sind beim Drucke der letzten Tabelle auf S. 462 dieses Bandes die Zahlen für den Eiweissgehalt der Milch aus dem Satze herausgefallen. Ich theile deshalb in Folgendem die vollständige Tabelle mit:

Species	Zeit der Verdoppelung des Körpergewichts vom neugeborenen Thiere in Tagen	100 Gewichtstheile Milch enthalten:			
		Eiweiss	Asche	Kalk	Phosphorsäure
Mensch	180	1,6	0,2	0,0328	0,0473
Pferd	60	2,0	0,4	0,124	0,131
Rind	47	3,5	0,7	0,160	0,197
Ziege	22	3,67	0,7713	0,1974	0,2840
Schaf	15	4,88	0,8406	0,2453	0,2928
Schwein	14	5,21	0,8071	0,2489	0,3078
Katze	9 $\frac{1}{2}$	7,00	1,02	—	—
Hund	9	7,44	1,3282	0,4545	0,5078
Kaninchen	6	10,38	2,4998	0,8914	0,9967

M. DuMont-Schauberg, Strassburg.

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. F. HOFMEISTER in Strassburg, Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Prof. E. LUDWIG in Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. C. A. PEKELHARING in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Marburg.

ACHTUNDZWANZIGSTER BAND.

Mit zwei lithographischen Tafeln und vier Abbildungen.

STRASSBURG
VERLAG VON KARL J. TRÜBNER
1899.

Inhalt des achtundzwanzigsten Bandes.

HEFT I und II.

(Ausgegeben am 10. August 1899.)

	Seite
Küster, William. Spaltungsprodukte des Hämatins	1
Küster, William, und Martin Kölle. Ueber Darstellung und Spaltungsprodukte des Hämatoporphyrins	34
Roos, E. Untersuchungen über die Schilddrüse	40
Okerblom, Johann. Die Xanthinkörper der Nebennieren	60
Dzierzowski, S. Zur Frage «Ueber das krystallinische Fibrin» .	65
Salaskin, S., und J. Zaleski. Ueber die Harnstoffbestimmung im Harne. Mit einer Abbildung	73
Kutscher, Fr. Ueber das Antipepton. (Mittheilung III.)	88
Hammarsten, Olof. Weitere Beiträge zur Kenntniss der Fibrinbildung	98
Giertz, K. H. Zur Kenntniss der Pseudonucleine	115
Kutscher, Fr. Der Nachweis der Glutaminsäure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten des thierischen Eiweisses	123
Zunz, E. Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweiss-spaltung. Mit zwei Tafeln	132
Spiro, Karl. Ueber Nachweis und Vorkommen des Glycocols . .	174
Landolt, H. Ueber das Melanin der Augenhäute	192
Cohn, R. Zur Frage der Zuckerbildung aus Eiweiss	211

HEFT III und IV.

(Ausgegeben am 5. Oktober 1899.)

Plek, Ernst P. Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. I. Theil.	219
Blum, F. Ueber die Jodzahl der Eiweisskörper	288
Bunge, G. von. Ueber die Zusammensetzung des Knorpels vom Haifisch	300
Lawrow, D. Ueber die Wirkung des Arginins auf die tryptische Verdauung der Eiweisskörper	303

	Seite
Fleroff, A. Ueber einen histonähnlichen Körper aus Thymus . . .	307
Morkowin, N. Ein Beitrag zur Kenntniss der Protamine	313
Abel, John J. Ueber den blutdruckerregenden Bestandtheil der Nebenniere, das Epinephrin	318
Panzer, Theodor. Ueber das Eierstockcolloid	363
Kossel, A., und F. Kutscher. Ueber das Histidin. Mit zwei Ab- bildungen	382
Lawrow, D. Ueber die Spaltungsprodukte des Histons von Leu- cocysten	388

HEFT V und VI.

(Ausgegeben am 14. November 1899.)

Osborne, W. A. Beiträge zur Kenntniss des Invertins. Mit einer Abbildung	399
Ascoli, Alberto. Ueber die Plasminsäure	426
Brahm, Carl. Ueber das Chinosol, sein Verhalten im Thierkörper und über die Bildung gepaarter Glukuronsäuren	439
Bunge, G. v. Der Kochsalzgehalt des Knorpels und das biogene- tische Grundgesetz	452
Schulze, E., und E. Winterstein. Nachweis von Histidin und Lysin unter den Spaltungsprodukten der aus Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen	459
Schulze, E. Ueber das Vorkommen von Histidin und Lysin in Keimpflanzen	465
Mörner, Karl Th. Beitrag zur Kenntniss einiger Eigenschaften des Glutins	471
Siegfried, M. Zur Kenntniss der Extractivstoffe des Muskels . .	524
Krüger, Richard Th., Zur Kenntniss der Nucleone	530
J. J. R. Macleod M. B. Zur Kenntniss des Phosphors im Muskel	535
Marcus, Emil. Ueber in Wasser lösliches Seroglobulin	559
Wang, Eyvin. Ueber die rothbraunen Farbstoffe bei der quanti- tativen Bestimmung des Harnindicans	576
Lawrow, D. Ueber Benzoylirung der Hexonbasen	585
Katsuyama, K., unter Mitwirkung der Herren T. Kuwahara und K. Seno. Ueber den Einfluss des Theins auf die Aus- scheidung von Alkalien im Harn. (I. Mittheilung)	587
Mörner, K. A. H. Cystin ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz	595

Spaltungsprodukte des Hämatins.

Von
William Küster.

(Mittheilung aus dem physiol. chem. Institute zu Tübingen; die Untersuchungen sind mit Unterstützung des Elizabeth-Thompson Science Fund in Boston ausgeführt worden.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Juni 1899.)

Die Hauptresultate der Untersuchung nebst theoretischen Schlussfolgerungen.

Meine bisherigen Arbeiten bezüglich der Spaltung, welche in Eisessig gelöstes Hämatin durch Natriumdichromat erleidet, hatten ergeben, dass im Wesentlichen gut krystallisirende, wasser- und aetherlösliche Producte neben einem nur in Alkalien löslichen, amorphen Körper entstehen, der noch eisenhaltig ist. Die besten Ausbeuten an beiden erhielt ich bei Verwendung einer Menge des Oxydationsmittels, welche 12 Atomen Sauerstoff auf die Molekel Hämatin entspricht, und zwar 33 resp. 30% vom Ausgangsmaterial.¹⁾

Wie ich zeigte, bestehen die ätherlöslichen Produkte — neben geringen Mengen von auch aus alkalischer Lösung in Aether übergehenden Körpern — aus einem Gemische von Säuren, unter denen zwei in wechselnden Mengen vorwalten. Für letztere wurde die empirische Zusammensetzung als durch die Formeln $C_8H_9NO_4$ und $C_8H_8O_5$ gegeben ermittelt. Und zwar geht die erstere bei der Einwirkung von Alkalien unter Abspaltung von Ammoniak glatt in die letztere über.²⁾ Sie

1) Beiträge z. K. d. Hämatins. Tübingen 1896 bei F. Pietzker, sowie Ber. 29, 821.

2) cf. Ber. 32, 677 und die folgende Mittheilung.

wurden einstweilen «zweibasische Hämatinsäure»¹⁾ und «Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure» genannt, in Ermangelung jeglichen Anhaltspunktes für ihre Constitution.

Mit diesen Produkten schien aber die Reihe der Spaltungsstücke schwerlich erschöpft zu sein, wenn auch durch einige Aenderungen in den Arbeitsmethoden die Ausbeute an den Säuren bis auf 40% vom verwendeten Hämatin gesteigert wurde. Ich habe daher — z. T. in Gemeinschaft mit Herrn Kölle — weitere Versuche angestellt, bei denen die Ermittlung andersartiger Oxydationsprodukte angestrebt wurde. Um diesen Zweck zu erreichen, mussten naturgemäss die Bedingungen bei der Oxydation gewechselt werden, sowohl was Menge und Art des oxydirenden Mittels, als was die Reaction des lösenden Mittels betraf.

Die Resultate dieser Untersuchungen, welche in Bezug auf weitere organische Spaltungsprodukte meist negativ waren und daher auch die schon gewonnenen Kenntnisse nur in wenigen Punkten erweitern, seien zunächst kurz zusammengestellt.

Als Ausgangsmaterial diente «Hämin», das theils nach der Vorschrift Schalfejew's,²⁾ theils nach Nencki's Verfahren³⁾ hergestellt wurde. Die erste Methode gibt recht gute Ausbeuten (3 gr. bis 4,5 gr. pro Liter Blut) und ist daher namentlich dann zu empfehlen, wenn die Menge des betreffenden Bluts eine beschränkte ist.

Was die zweite Methode betrifft, so zeigte ich ja schon früher,⁴⁾ dass noch bessere Ausbeuten, als Nencki angibt, erhalten werden, sobald zur Extraction des schärfer getrockneten Blutpulvers der gebrauchte Isoamylalkohol von früheren Versuchen wieder verwendet wird. Es wird dann allerdings nicht mehr reines «Hämin» $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$ erhalten, sondern es

1) Auf Grund der Analyse des Silbersalzes, welches zwei Atome Metall enthält; die Titration mit Ammoniak ergab später, dass $C_8H_9NO_4$ «einbasisch» ist.

2) Ber. 18, 232 c.

3) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. XVIII, 401.

4) l. c. S. 15.

entstehen Produkte, die weit ärmer an Chlor sind, als es obige Formel verlangt. Dabei sind auch diese «Hämine» noch gut krystallisirende Körper, und aus den Resultaten der Analysen möchte man schliessen, es habe eine Abspaltung von Chlorwasserstoff stattgefunden. Nur vereinigen sich diese Produkte nicht etwa wieder mit Salzsäure zum Hämin p. e.¹⁾

Um aber zu prüfen, ob ein um die Elemente der Salzsäure ärmerer Körper $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{FeO}_3$ herzustellen sei, wurde in einer Reihe von Versuchen reines «Hämin» mit Anilin in Reaction gebracht, welcher Körper ja z. B. aus Bornylchlorid HCl abspaltet.²⁾ Leider wurde bisher kein reines Product erhalten; das Anilin scheint in verschiedenem Sinne zu wirken, indem theils Chlorwasserstoff abgespalten, theils Chlor durch die Gruppe NHC_6H_5 ersetzt wird; und bei höherer Temperatur wird auch Eisen herausgelöst.

Die Ueberführung des Hämins in Hämatin wird bekanntlich durch Alkalien bewirkt, der Process ist nach Nencki so aufzufassen, dass ein Ersatz von Chlor durch Hydroxyl stattfindet. Demgemäss wird dem Hämatin die Formel $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{FeO}_4$ zugeschrieben.

Mir war es nun früher nie geglückt, Analysenresultate zu erhalten, welche mit obiger Formel harmonirten; immer fielen die Werthe für Kohlenstoff, oft auch die für Wasserstoff zu niedrig aus, so dass ich mich zu der Aeusserung veranlasst fand, die Ueberführung von Hämin in Hämatin dürfte glatt nicht unter jeder Bedingung vor sich gehen.³⁾

Nun hat neuerdings⁴⁾ Bialobrzski die Methode genauer angegeben, welche reines Hämatin liefert, und nach dieser

1) Auch ist noch von keinem Forscher ein Körper dargestellt worden, der solche Eigenschaften besässe; trotzdem wird immer noch das «Hämin» als «salzsaures Hämatin» oder salzsaures Hämin bezeichnet und Hämin ein um HCl ärmerer Körper genannt, den es gar nicht gibt. Cf. z. B. Jolles, Wiener klin. Rundschau 1899, Heft 14/16, 5, dessen Ansicht, dass man von einer Constitution bei so hochmolekulären Complexen nicht sprechen könne, ich durchaus nicht theilen kann.

2) Ann. 230, 233. Ber. 25, 916.

3) Ber. 29, 823.

4) Ber. 29, 2846.

arbeitend, gelang es R. v. Zeynek,¹⁾ im hiesigen Institute ein Hämatin darzustellen, das bei der Analyse mit Nencki's Formel übereinstimmende Werthe ergab. In der That ist es nothwendig, bei der Einwirkung des Alkalis Zimmertemperatur einzuhalten; wie aus meinen Analysen hervorgeht, werden sonst für Kohlen- und Wasserstoff zu niedrige Werthe erhalten, während die für Stickstoff und Eisen sich nicht ändern.²⁾ Diese Thatsache, die allerdings erst an einem nach Schälfejew dargestellten Häminpräparate beobachtet wurde, verdient, sollte sie sich durchweg bestätigen, Interesse. Denn sie spräche dafür, dass bei längerer Einwirkung von Alkali, namentlich in der Wärme, eine Aufnahme von Sauerstoff und — gegen meine Erwartung — nicht eine Abspaltung von Stickstoff, sondern eine solche einer Kohlen- und Wasserstoff haltenden Gruppe eintritt.

Die aus dem mit gebrauchtem Amylalkohol dargestellten Hämin gewonnenen Hämatinpräparate wurden nicht analysirt.

Ueberhaupt kam zu den später beschriebenen Oxydationsversuchen meist ein Material zur Verwendung, dessen Reinigung nur durch mehrmaliges Behandeln mit verdünnter Salzsäure bewirkt worden war. Es ist daher nicht unmöglich, dass die wechselnden Ausbeuten an den Hämatinsäuren, sowie das Vorwiegen der einen oder der andern, ferner die wechselnde Zusammensetzung des eisenhaltigen Körpers, das Auftreten einer geringen Menge von Nebenprodukten auf Veränderungen zurückzuführen sind, die das «Hämin» vielleicht schon während der Darstellung, vielleicht auch bei der Ueberführung in Hämatin erlitten hat. Eine wesentliche Bedeutung kann ihnen indessen nicht zukommen, denn die Säuren $C_8H_9NO_4$ oder $C_8H_9O_5$ waren immer vorhanden und bildeten stets die Hauptmenge der ätherlöslichen Theile.

Andere Verfahren zur Darstellung von «Hämin»³⁾ konnten

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. XXV, S. 503.

2) Neuerdings will Cazeu neue sogar eine Einwirkung von kochendem Wasser auf Hämatin beobachtet haben. Bull. de la soc. chim. de Paris [3] 21, 372.

3) Cloëtta, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 36, 349.
Rosenfeld, ibid. 40, 137.

für mich nicht in Frage kommen, da sie zu geringe Ausbeuten geben. Es wäre allerdings interessant, auch solche Hämine, welche nach den Analysen Cloëttas und Rosenfeld's nur drei Stickstoffatome im Molekül enthalten, nach meiner Methode zu oxydiren, um zu erfahren, ob sie noch den «Hämatinsäuren» liefernden Kern enthalten. Was die Mörner'sche¹⁾ Methode anbelangt, so habe ich leider seine guten Ausbeuten von 3 bis 3,5 gr. pro Liter Blut trotz vieler Versuche nie erreichen können.

Um nun die Spaltungsprodukte des Hämatins — womöglich auch der Menge nach — feststellen zu können, wurde die Oxydation theils in saurer, theils in alkalischer Lösung vorgenommen.

A. Oxydation des Hämatins in eisessigsaurer Lösung mit Natriumdichromat bezw. Calciumchromat.

a) In eisessigsaurer Lösung nimmt eine Molekel Hämatin bei Zimmertemperatur in kurzer Zeit 8 Atome Sauerstoff auf, welche ihr in Form von Natriumdichromat in wässriger Lösung geboten werden. Schon hierbei tritt eine wesentliche Spaltung ein, denn es konnten ca. 14% ätherlösliche Säure²⁾ neben einem dem Hämatin sehr ähnlichen Körper erhalten werden. Letzterer lieferte bei weiterer Oxydation in alkalischer Lösung durch Kaliumpermanganat noch reichliche Mengen derselben ätherlöslichen Säure von der Formel $C_8H_8O_8$.

b) 12 Atome Sauerstoff werden bei Zimmertemperatur nur während wochenlangen Stehens, rascher, d. h. in ca. einem Tage, beim Erwärmen auf 50—60° aufgenommen.

Die Spaltung der Hämatinmolekel ist eine vollständige, es können bis zu 40% derselben an ätherlöslichen Produkten, und ca. 40% des eisenhaltigen, nur in Alkalien löslichen Körpers, welcher bei verschiedenen Versuchen wechselnde Zusammensetzung zeigt, gewonnen werden. Ausserdem wird Kohlendioxyd abgespalten, allerdings nur in ganz geringer Menge. Sie betrug

1) Sonderabdruck aus dem Nordiskt Medicinskt Arkiv. Festband Nr. I, S. 3.

2) Sie bestand bei diesem Versuche zum grössten Theil aus $C_8H_8O_8$.

bei mehreren Bestimmungen $\frac{1}{60}$, $\frac{1}{40}$ und $\frac{1}{55}$ des in der verwendeten Hämatinmenge vorhandenen Kohlenstoffs.

Flüchtige Säuren, reducirend wirkende Körper oder neutrale flüchtige Stoffe liessen sich nicht auffinden, desgl. waren organische Basen nicht nachweisbar. Dagegen wurde Ammoniak manchmal in reichlicher Menge abgespalten, und zwar betrug die Quantität des in Ammoniak übergeführten Stickstoffs $\frac{1}{11}$ bis $\frac{2}{7}$ des im verwendeten Hämatin vorhandenen.

Gewöhnlich herrschte dann in den Fällen, welche viel Ammoniak ergaben, unter den ätherlöslichen Säuren der Körper $C_6H_5O_5$ gegenüber $C_6H_5NO_4$ vor, welches letzterer also nicht nur unter der Einwirkung von Alkalien Ammoniak abspaltet, was ja, wie schon erwähnt, ausserordentlich leicht geschieht, sondern unter bestimmten Bedingungen auch schon während der in saurer Lösung verlaufenden Hydrolyse, welche sicher neben der Oxydation einhergeht.

Durch weitere Oxydation des erwähnten eisenhaltigen Produkts mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung konnten endlich von Herrn Kölle allerdings nur geringe Mengen von $C_6H_5O_5$ erhalten werden.

Um bei der Aufarbeitung der Oxydationsrückstände nicht auf Natriumsalze zu stossen, wurde neuerdings bei mehreren Versuchen der Sauerstoff in Form von Calciumchromat zugeführt. Der Verlauf der Oxydation, sowie Art und Menge der wesentlichen Produkte wichen hierbei von den früheren Ergebnissen nicht ab. Es sei aber erwähnt, dass die anfänglich aus saurer, bei der Reinigung der Rohsäuren aber aus alkalischer Lösung in den Aether übergehenden Theile, deutlichen Geruch nach Pyridin¹⁾ aufwiesen. Leider reichte die geringfügige Menge nicht zu eingehender Untersuchung aus.

Nach möglichster Entfernung aller anorganischen Salze liessen sich aber auch jetzt weitere Spaltungsprodukte nicht nachweisen.

¹⁾ Das betreffende Häm in war nach Schallfejew's Methode gewonnen, sonst würde das Auftreten von Pyridingeruch nichts beweisen, da ja der Amylalkohol solche Basen enthält.

cf. Bamberger und Einhorn. Ber. 30. 224.

c) 20—22 Atome Sauerstoff werden nur bei 2—3 tägigem Erhitzen im siedenden Wasserbade aufgenommen. Die Ausbeute an ätherlöslichen Produkten steigt bis auf ca. 48% vom verwendeten Hämatin, die näheren Bestandtheile derselben sind von gleicher Art wie bei Verwendung von 12 Atomen. Der eisenhaltige Körper verschwindet fast völlig, und zwar scheint ein grosser Theil des in ihm enthaltenen Kohlenstoffs verbrannt zu werden. Wenigstens konnten bis 9,2% vom Gesamtkohlenstoff als Kohlendioxyd nachgewiesen werden.

Die Abspaltung von Ammoniak bewegt sich in den früher beschriebenen Grenzen.

Andere Produkte konnten bis jetzt nicht gefasst werden; Spuren organischer Substanz, die sich als stickstofffrei erwies, wurden bei Verwendung von Calciumchromat nach möglichster Entfernung aller Salze durch absoluten Alkohol extrahirt.

B. Oxydation des Hämatins in alkalischer Lösung.

a) Oxydationsmittel: Ferricyankalium.

Bei der Oxydation des in starker Kalilauge gelösten Hämatins durch Ferricyankalium entsteht ebenfalls $C_8H_8O_5$, wenn auch in recht geringer Menge: bei Verwendung von 8 Atomen Sauerstoff wurde sogar etwas mehr davon als bei 12 Atomen erhalten. Daneben bildet sich ein dem Hämatin recht ähnlicher Körper, der bei weiterer Oxydation mit Ferricyankalium auch weitere Mengen $C_8H_8O_5$ lieferte.

Flüchtige organische Säuren konnten nicht nachgewiesen werden. Das Eisen scheidet sich als Oxyd ab.

b) Oxydationsmittel: Ammoniumsulfat.

Die Einwirkung dieses Salzes auf in Natronlauge gelöstes Hämatin wurde so weit getrieben, dass sich die stets alkalisch zu haltende Lösung fast entfärbte. Hierbei scheidet sich schliesslich das Eisen als Oxyd ab, flüchtige Säuren scheinen in geringer Menge aufzutreten; während der Oxydation, welche durch Erwärmen auf dem Wasserbade unterstützt wurde, machte sich neben dem Ammoniak ein schwacher Geruch nach Blausäure bemerkbar.

Auch hier entstehen endlich ätherlösliche Säuren, unter ihnen eine stickstofffreie, welche nach allen Reactionen als Bernsteinsäure angesprochen werden darf.

C. Oxydation von Hämatoporphyrin.¹⁾

Das von Nencki aufgefundene eisenfreie Hämatoporphyrin $C_{16}H_{18}N_2O_3$ ²⁾ liefert in Eisessig gelöst bei der Oxydation mit Natriumdichromat die gleichen ätherlöslichen Säuren wie das Hämatin. Bemerkenswerth ist, dass die Oxydation langsamer vorschreitet und schon die Aufnahme von 5 Sauerstoffatomen nur durch Erhitzen auf dem Wasserbade erreicht werden kann. Es ist daher nicht unmöglich, dass das im Hämatin enthaltene Eisen eine beschleunigende Wirkung auf den Verlauf der Oxydation ausübt, wie denn auch Fenton³⁾ den gleichen Einfluss von Ferrosalzen bei der Oxydation mehrwerthiger Alkohole beobachtet hat.

Ausser den Säuren wurden Kohlendioxyd und Ammoniak als Spaltungsprodukte nachgewiesen, ein wesentlicher Theil vom Hämatoporphyrin bleibt schliesslich als ein nur in Alkalien lösliches Produkt übrig, welches aber noch nicht näher untersucht wurde.

Schlussfolgerungen.

Nehmen wir an, das Hämatin sei ein einheitlicher Körper und der Uebergang in Nencki's Hämatoporphyrin $C_{32}H_{32}N_4FeO_4 + 2H_2O - Fe = 2C_{16}H_{18}N_2O_3$ verlaufe quantitativ, so folgt, dass das Hämatin symmetrisch gebaut sein muss, d. h. es besteht aus zwei einander gleichen Theilen, welche durch das Eisen zusammengehalten werden. Da nun das Hämatin und das Hämatoporphyrin bei der mit Hydrolyse ver-

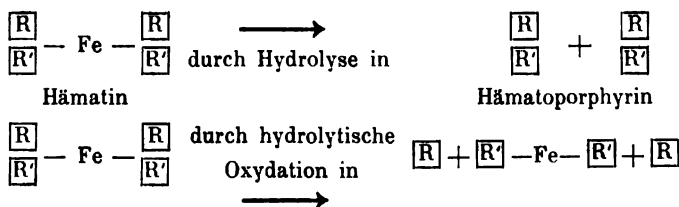
¹⁾ Die experimentellen Belege finden sich in der folgenden Arbeit.

²⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharmac. 24, 430.

³⁾ Proceedings of the chem. Soc. 97/98, N. 194, 119/20. 98/99 N. 200-240. Ref. C. B. 98/1 16, 99/1 249; cf. auch Cross Bevan u. Smith Proc. chem. Soc. 97/98 194, 115. Ref. C. B. 98/1 19, und Morell. Crofts u. Smith Proc. chem. Soc. 15, 99. Ref. C. B. 99/1 1160.

bundenen Oxydation dieselben Säuren und auch eine gleiche Menge derselben geben, die Säuren ferner 8 Atome Kohlenstoff im Molekül enthalten (wie durch Molekulargewichtsbestimmung sicher bewiesen wurde), so zerfällt also auch das Hämatoporphyrin wieder in zwei Komplexe mit je 8 Kohlenstoffatomen. Von diesen wird der eine in $C_8H_9NO_4$ übergeführt, was aus der 40—48% betragenden Ausbeute an roher Säure geschlossen werden kann.

Die Vorgänge würden sich etwa durch folgendes Bild veranschaulichen lassen, wo jedes der Quadrate R und R' einen Complex bedeutet, der 8 Kohlenstoffatome enthält.



Aus R geht dann die «zweibasische Hämatinsäure» $C_8H_9NO_4$ hervor, über die andere Hälfte ist noch kein Aufschluss zu geben; die weitere Untersuchung des alkalilöslichen, bei Verwendung von Hämatin eisenhaltigen Produkts wird hier vielleicht Aufklärung schaffen.

Die Annahme endlich, das Eisen werde vermitteltst Cyangruppen festgehalten, welche von vornherein plausibel erscheint, konnte experimentell immer noch nicht sicher begründet werden. Für dieselbe spricht z. B. das Auftreten des Geruchs nach Blausäure bei der Oxydation durch Ammoniumpersulfat, welche ja bis zur völligen Abscheidung des Eisens (als Oxyd) durchgeführt wurde. Für dieselbe spricht auch die Thatsache, dass stets ein Theil des Stickstoffs in Ammoniak übergeführt wird, selbst wenn unter den ätherlöslichen Säuren nur $C_8H_9NO_4$ aufzufinden ist, während ein Theil des Eisens abgespalten wird und sich beim Aufnehmen des erwähnten eisenhaltigen Körpers in Alkalien als nicht löslich abtrennen lässt.

Endlich möchte ich hervorheben, dass die Säure $C_8H_9NO_4$ mit dem Pyrrol in Beziehung stehen muss, dass hier also der

Theil des Hämatins vorliegt, welcher bei der trocknen Destillation¹⁾ dieses Körpers in Pyrrol übergang.

Herr Kölle²⁾ machte nämlich die folgenden Beobachtungen: Wird das Ammoniumsalz von $C_8H_9NO_4$ der trocknen Destillation unterworfen, so geht schon bei niederer Temperatur ein gelbbraunes Oel über, das intensiv nach Pyrrol riecht und einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspahn karminroth färbt. Das Oel gibt mit Wasser eine gelbliche Lösung, die sich mit Salzsäure angesäuert und eingedampft, nach und nach stark röthet und zuletzt ein amorphes, glänzendes Harz abscheidet. Nencki und Sieber fanden aber ganz die gleichen Eigenschaften bei einem Produkt, das durch Reduction einer alkoholischen Häminlösung mit Zinn und Salzsäure und durch nachherige Destillation der mit Alkali übersättigten Lösung erhalten wurde.³⁾

Ausserdem verharzen die schön krystallisirenden Körper $C_8H_9NO_4$ und $C_8H_8O_5$ sehr leicht, sie liefern braune amorphe Pulver, wie das grade bei Furan- und Pyrrolderivaten des öfteren beobachtet wurde.

Wird schliesslich eine Lösung von $C_8H_9NO_4$ in concentrirter Salzsäure erhitzt, so tritt eine intensive Färbung ein, welche an die des Hämatoporphyrins erinnert, ohne aber ein charakteristisches Absorptionsspectrum zu geben.

Experimenteller Theil.

I. Darstellung des Hämins und Hämatins.

A. Das Ausgangsmaterial für meine Untersuchungen bilden die Teichmann'schen Blutkrystalle: das «Hämin», welches nach dem Verfahren von Nencki und Sieber⁴⁾ in einer Ausbeute von 0,5—1 g pro Liter Blut erhalten wird. Die empirische Zusammensetzung dieses Hämins wurde von ihnen als durch die Formeln $(C_{32}H_{51}ClN_4FeO_3)_4C_5H_{12}O$ (für das frisch

1) Hoppe-Seyler, medic. chem. Untersuchg., S. 523 ff.

2) Inaug.-Dissert. (Tüb. 1898 bei F. Pietzker), S. 15.

3) Arch. f. exp. Path. u. Pharmacol., Bd. XVIII, S. 418.

4) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XVIII S. 401 u. XX. S. 325.

dargestellte) und $C_{32}H_{51}ClN_4FeO_3$ (für das bei 130° getrocknete Produkt) gegeben ermittelt. Diese Angaben konnte ich im Wesentlichen bestätigen,¹⁾ muss aber betonen, dass es nicht immer glückte, durch Extraction mit reinem Isoamylalkohol Produkte von obiger Zusammensetzung zu erhalten. Der Chlorgehalt wird häufig zu gering befunden, selbst wenn die von mir als nothwendig erkannten Cautelen²⁾ bei der Reinigung des Rohmaterials streng befolgt werden. Diese wurde aber so gehandhabt, dass zunächst der anhaftende Isoamylalkohol durch Aethylalkohol verdrängt und dann die Masse mit 1%iger Salzsäure behandelt wurde, bis ein rasches, klares Absetzen stattfindet. Bei den zur Analyse kommenden Antheilen wurde nun dieses Verfahren eventuell so lange fortgesetzt, bis die Häminkrystalle sich unter dem Mikroskope als frei von Beimengungen erwiesen. Alsdann wurden sie mit kaltem Wasser chlorfrei gewaschen, im Vacuum getrocknet, mit absolutem Alkohol angerieben und mit Aether behandelt, bis derselbe fast farblos ablief. Ich führe nunmehr die Analysen von vier in neuerer Zeit erhaltenen Präparaten aus verschiedenen Blutarten an.

Präparat I³⁾, aus Rindsblut hergestellt, im Vacuum getrocknet.

1. 1,1609 g verloren bei $2\frac{1}{4}$ stündigem Erhitzen bis auf 150° im Ganzen 0,0317 g.

2. 0,1738 g gaben 0,3992 g CO_2 , 0,0885 g H_2O und 0,0224 g Fe_2O_3 .

3. 0,2236 g gaben 18 ccm. N bei 730 mm. B. und $7,4^\circ$.

4. 0,1872 g gaben 0,0402 g AgCl und 0,0238 g Fe_2O_3 (Carius).

Präparat II, aus Schafblut hergestellt, im Vacuum getrocknet.

1. 1,0378 g verloren bei $1\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen auf $130-140^\circ$ im Ganzen 0,0402 g.

2. 0,2034 g gaben 0,4738 g CO_2 , 0,1038 g H_2O und 0,0244 g Asche.

¹⁾ Ber. 27, 572. Beiträge z. K. des Hämatins. Tüb. bei Pietzker, S. 10—15. Ber. 30, 109.

²⁾ l. c. S. 11.

³⁾ Die Resultate der Analysen dieses Präparats sind bereits Ber. 29, 822 angeführt und dort auf $(C_{32}H_{51}ClN_4FeO_3)_6$, $C_6H_{12}O$ bezogen, welche Formel dem Gewichtsverlust bei 150° und den erhaltenen Werthen besser entspricht.

3. 0,3035 g gaben 25,2 ccm. N bei 711 mm. B und 8°.
4. 0,2648 g gaben 0,0485 g AgCl und 0,0336 g Fe_2O_3 (Carius).

Präparat III, aus einmal umkrystallisiertem Oxyhämoglobin vom Pferde dargestellt, bestand aus braunschwarzen Prismen sowie deren Trümmern oder Verwachsungen.

1. 0,2269 g gaben 0,5196 g CO_2 und 0,1191 g H_2O .
2. 0,2694 g gaben 0,0503 g AgCl und 0,0332 g Fe_2O_3 .
3. 0,1864 g gaben 14,8 ccm. N bei 726 mm. B. und 10°.

Präparat IV, wie das vorherige erhalten.

1. 0,2373 g gaben 0,5409 g CO_2 und 0,1148 g H_2O .
2. 0,2088 g gaben 0,4773 g CO_2 und 0,1049 g H_2O .
1. 2. 0,4461 g gaben 0,0557 g Fe_2O_3 .
3. 0,2541 g gaben 0,0530 g AgCl und 0,0309 g Fe_2O_3 .
4. 0,1843 g gaben 14,7 ccm. N bei 726 mm. B. und 8°.

Berechnet für		Gefunden				
$(\text{C}_{88}\text{H}_{112}\text{ClN}_4\text{FeO}_3)_x \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}$	I.	II.	III.	IV.		
% C	63,08	62,64	63,53	62,46	62,17	62,35
% H	5,38	5,66	5,91	5,83	5,37	5,58
% N	8,85	9,35	9,37	9,08	9,17	—
% Fe	8,85	9,02	8,89 }	8,44 }	8,88 }	8,76 }
% Cl	5,59		5,32 }	4,53 }	4,62 }	5,17 }
% $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$	3,48	2,73	3,87	—	—	—

Des Weiteren zeigte ich dann, dass die Ausbeuten an Hämin erhöht und bis auf 44% der theoretisch berechneten gebracht werden können, wenn der schon einmal gebrauchte Amylalkohol wieder verwendet, dafür aber das Blutpulver so stark getrocknet wird, dass es nur noch 30—40% Feuchtigkeit enthält. Die so erhaltenen Präparate entsprechen indessen nicht mehr obiger Formel, namentlich sinkt der Chlorgehalt bei Verwendung 3—4 mal gebrauchten Amylalkohols bis auf Spuren, so dass wohl eine Verseifung oder eine Abspaltung von Chlorwasserstoff eintritt.¹⁾

Einige Analysen mögen auch diese Verhältnisse veranschaulichen. Präparat V, aus Rinderblut mit bereits einmal gebrauchtem Amylalkohol extrahiert.

¹⁾ Der niedere Chlorgehalt könnte auch so gedeutet werden, dass in solchen Präparaten nicht mehr «Hämin p. e.» vorliegt, sondern vielleicht höhere Homologe desselben; in diesem Sinne sprach ich mich Ber. 29, 822 aus.

1. 0,4414 g verloren bei 140° im Ganzen 0,0084 g.
2. 0,2379 g gaben 0,5590 g CO₂ und 0,1292 g H₂O.
3. 0,1900 g gaben 0,4457 g CO₂.
4. 0,2395 g gaben 0,0452 g AgCl und 0,0287 g Fe₂O₃ (Carius).
5. 0,2730 g gaben 23,2 ccm. N bei 4,8° und 717,8 mm. B.

Präparat VI, aus Schafblut mit schon einmal gebrauchtem Amylalkohol extrahirt.

1. 0,9052 g verloren bei 135—145° 0,0196 g im Ganzen.
2. 0,2401 g gaben 0,5586 g CO₂ und 0,1325 g H₂O.
3. 0,2633 g gaben 20,4 ccm. N bei 724 mm. B. und 9°.
4. 0,3144 g gaben 0,0600 g AgCl und 0,0394 g Fe₂O₃ (Carius).

Präparat VII, aus Rinderblut mit ganz altem Amylalkohol extrahirt, besteht aus wesentlich kleineren Krystallen von mehr rundlicher Form, setzte sich sehr rasch ab und erwies sich unter dem Mikroskope als einheitlich.

1. 0,1945 g gaben 0,4654 g CO₂, 0,1009 g H₂O und 0,0241 g Asche.
2. 0,2400 g gaben 19,2 ccm. N bei 722,5 mm. B und 3,5°.
3. 0,2745 g gaben 0,0066 g AgCl und 0,0348 g Fe₂O₃ (Carius).

Gefunden:	V.	VI.	VII.
% C	64,08 } 63,98	63,45 }	65,26 }
% H	6,03 }	6,13 }	5,76 }
% N	9,81	8,87	9,38
% Fe	8,39 }	8,78 }	8,88 }
% Cl	4,67 }	4,72 }	0,59 }
% C ₅ H ₁₀ O	1,90	2,16	—

Aus diesen Befunden folgt, dass das Chlor sehr leicht aus der Häminmolekel herauszunehmen ist; eine Deutung des Verlaufs der solches bewirkenden Prozesse ist freilich aus den erhaltenen Zahlen nicht möglich. Nun wird ja das Chlor bei der Verseifung mittelst Alkalien leicht durch Hydroxyl ersetzt, bis auf Spuren wenigstens, die sich schwer entfernen lassen. Andererseits war es denkbar, dass sich das Chlor durch geeignete Mittel in Form von Chlorwasserstoff abspalten lasse, welcher Process einen Körper C₃₃H₃₀N₄FeO₃ hätte liefern müssen. Ich habe zu diesem Zweck Anilin auf Hämin einwirken lassen, das schon in der Kälte lösend wirkt,¹⁾ und in

1) Nur ein Häminpräparat, welches nach Schalfesjew dargestellt war, löste sich selbst in kochendem Anilin unvollständig und hinterliess Krystalle, welche in ihrer Form sehr an den von mir dargestellten Häminester der Essigsäure erinnerten.

der That eine Abspaltung von HCl beobachtet. Doch hielten die übrigens in Chloroform leicht löslichen Produkte hartnäckig ca. 1,5% Chlor zurück. Siedendes Anilin bewirkt einen tieferen Zerfall der Häminmolekel: der entstandene Körper enthielt nur noch 3,7% Eisen.

Da ich also zu einem einheitlichen Produkte nicht gelangen konnte, habe ich diese Reaction einstweilen nicht weiter verfolgt.

B. Ein weiterer Theil des Hämins wurde nach Schalejew's Methode¹⁾ hergestellt: Blut wird durch Eisessig zersetzt und nun im Gegensatze zu Nencki's Verfahren alle Bestandtheile des Bluts durch einen grossen Ueberschuss von Eisessig gelöst, während sich das Hämin unlöslich abscheidet. Wird die vorgeschriebene Temperatur von 80° bei der Darstellung genau eingehalten, so sind die Ausbeuten meist sehr gute. Das Absetzen der Krystalle vollzog sich einmal bei Pferdeblut in 30 Minuten; aus einem Liter wurden hier 4,6 g im Vacuum getrocknetes Hämin erhalten. Auch ein Liter Rinderblut lieferte im Durchschnitt 4 g. Manchmal scheiden sich allerdings die Häminkrystalle in so feiner Form ab, dass ein wochenlanges Stehen erforderlich ist, bis sie sich einigermaßen vollständig abgesetzt haben. Und zwar geschieht das trotz peinlichster Einhaltung aller Vorschriften. Es scheint lediglich die Beschaffenheit des Blutes eine Rolle zu spielen, z. B. ist ein etwas in Fäulniss gerathenes Blut durchaus zu vermeiden.

Es konnte in solchen Fällen das Absetzen befördert werden, wenn die ganze Reaktionsmasse nach Zusatz des gleichen Volumens Wasser und etwas concentrirter Salzsäure erhitzt wurde. Die Reinigung der abgesetzten Krystalle geschah durch Digeriren mit ca. 1%iger Salzsäure meist in der Wärme, bis die über dem sich rasch zu Boden senkenden Hämin stehende Flüssigkeit wasserklar war.

B. Was die Darstellung des Hämatins betrifft, so

1) Ber. 18, 232 c.

erwähnte ich schon, dass dieselbe nicht unter jeder Bedingung aus analysenreinem Hämin gelingt, insofern der erhaltene Körper nicht die für $C_{33}H_{32}N_4FeO_4$ berechneten Werthe ergibt. Die folgenden Versuche zeigen nun auch deutlich, dass das zur Ueberführung nöthige Alkali in der Wärme bei längerer Einwirkungsdauer Veränderungen im Hämatinmolekül hervorbringt.

3 g nach Schalfefjew's Methode dargestelltes und sorgfältig gereinigtes Hämin wurden getheilt; 1,5 g davon wurden mit wenig Alkohol und Natronlauge angerührt, die Masse mit kaltem Wasser aufgenommen, filtrirt, mit verdünnter Schwefelsäure gefällt, filtrirt und chlorfrei gewaschen. Das Lösen in ganz verdünnter, kalter Natronlauge und das Füllen durch Schwefelsäure wurde wiederholt, da von früher her bekannt war, dass die Herausnahme des gesammten Chlors durch einmaliges Lösen in Alkali nicht gelingt.¹⁾ Im Filtrate waren dann auch noch Spuren von Chlor nachweisbar. Der dann auch schwefelsäurefrei gewaschene Hämatinschlamm wurde scharf abgesaugt, schliesslich bei 100° getrocknet. (Präparat I).

Die andere Hälfte des Hämins wurde in gleicher Weise in Hämatin übergeführt, nur blieb die Lösung in Natronlauge jedes Mal 5 Stunden lang auf kochendem Wasserbade stehen. (Präparat II.)

Bei der Analyse erhielt ich nun die folgenden Resultate.

Präparat I.

1. 0,1778 g gaben 0,4200 g CO_2 , 0,0840 g H_2O und 0,0230 g Fe_2O_3 .
2. 0,4339 g gaben nach Kjeldahl 0,04102 g N.

Präparat II.

1. 0,1835 g gaben 0,4188 g CO_2 , 0,0845 g H_2O und 0,0238 g Fe_2O_3 .
2. 0,4177 g gaben nach Kjeldahl 0,03906 g N.

Berechnet für:



Gefunden:

		I.	II.
%	C	64,43	62,24
%	H	5,25	5,11
%	Fe	9,05	9,08
%	N	9,45	9,35

1) Auch Bialobrzewski fand in dem von ihm dargestellten Hämatin 0,3% Chlor. Ber. 29, 2846.

Dass endlich das Alkali bei längerer Dauer der Einwirkung auch schon in der Kälte in die Hämatinmolekel eingreift, geht aus folgendem Versuche hervor. Möglichst gereinigtes Hämin (1 Molekel) wurde in der berechneten Menge verdünnter Natronlauge (2 Molekeln) gelöst, filtrirt, und die Lösung der Dialyse unterworfen, bis das Chlornatrium entfernt war, was einige Wochen dauerte.¹⁾ Nun sollte versucht werden, eine Benzoylverbindung des Hämatins herzustellen, was bisher aus stark alkalischer Lösung nicht gelungen war, und auch jetzt nicht glückte, wie die Analyse beweist. Es wurden zu diesem Zwecke einige Tropfen Benzoylchlorid zu obiger Lösung gesetzt und bis zum Verschwinden des Geruchs geschüttelt. Es hatte sich ein reichlicher Niederschlag gebildet, der nun von der klaren Lösung abfiltrirt, chlorfrei gewaschen und nach dem Trocknen mit Aether extrahirt wurde, bis keine Benzoesäure mehr vorhanden war.

Bei der Analyse ergaben 0,2145 g : 0,4842 g CO_2 , 0,1030 g H_2O und 0,0287 g Fe_2O_3 d. h. 61,57% C, 5,33% H und 9,32% Fe. Also wurde auch hier ein viel zu niedriger Werth für den Kohlenstoff gefunden, eine Herausnahme von Eisen fand aber eben so wenig wie beim Erhitzen mit Alkali statt.

In welcher Weise das Alkali wirkt, kann aus den angeführten Versuchen noch nicht geschlossen werden.

II. Oxydation des Hämatins.

A. In eisessigsaurer Lösung mittelst Natriumdichromat oder Calciumchromat.

a. 55 g Hämatin²⁾ wurden in Form des feinen Schlammes, wie man ihn durch Füllen einer alkalischen Lösung mit einer Säure erhält, in der 60fachen Menge Eisessig gelöst und innerhalb dreier Tage mit der 8 Atomen Sauerstoff auf die Molekel

¹⁾ Die dialysirte Flüssigkeit muss das Natriumsalz des Hämatins enthalten; dieses konnte auch durch Alkoholäther gefällt werden. Der Niederschlag erwies sich aber für weitere Untersuchung als nicht geeignet.

²⁾ Der Versuch wurde schon 1896 ausgeführt, das Hämin war von Merck bezogen, das Lösen geschah in Portionen von ca. 5 g.

Hämatin entsprechend berechneten Menge Natriumdichromat (73,5 g) beschickt. Die Aufnahme des Sauerstoffs vollzog sich bei Zimmertemperatur. Die Hauptmenge der Essigsäure wurde nun auf freiem Feuer abdestillirt, der Rest auf dem Wasserbade entfernt. Hierbei scheidet sich ein dem Hämatin noch sehr ähnliches Produkt der Oxydation in reichlicher Menge unlöslich ab, das Gewicht betrug ca. 50 g (Körper A).

Nach Zusatz der berechneten Menge Schwefelsäure erfolgt weiteres Erhitzen, bis auch die gebunden gewesene Essigsäure verjagt ist. Dann wird die filtrirte Lösung ausgeäthert, der Aetherrückstand, wie früher angegeben,¹⁾ gereinigt.

Erhalten wurden 8 g ätherlösliche Säure, d. h. 14% vom verwendeten Hämatin. Diese Säure krystallisirte zum Theil schon nach dem Abdestilliren des Aethers. Durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser konnte ich 3,5 g in prächtigen Wetzsteinen erhalten; das Uebrige war ein Syrup, dessen stark sauer reagirende wässrige Lösung mit Calciumcarbonat behandelt wurde. Nach eintägiger Wirkung in der Kälte wurde filtrirt, das Filtrat zum Sieden erhitzt. Es entstand ein Ausfall im Gewicht von 1,83 g. Das Filtrat hiervon wurde nochmals mit Calciumcarbonat behandelt, die Lösung gab aber beim Erhitzen keinen Ausfall mehr. Beim Stehen im Vacuum krystallisirten zu Drusen vereinigte Nadeln aus, welche abgesaugt wurden (0,4 g), die Mutterlaugen ergaben amorphe, bisher nicht weiter untersuchte Kalksalze.

Die schön krystallisirende Säure (3,5 g) zeigte den Schmelzpunkt 97—98°, bei der Analyse ergaben 0,2073 g: 0,3971 g CO₂ und 0,0849 g H₂O. Darnach liegt der Körper C₈H₈O₅ vor, das «Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure».²⁾

Berechnet für C ₈ H ₈ O ₅ :			Gefunden:
%	C	52,18	52,25
%	H	4,35	4,55

1) l. c., S. 37.

2) cf. l. c., S. 41 und Ber. 29, 823, die später gewählte Bezeichnung «Lacton der dreibasischen Hamatinsäure», cf. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVI, S. 336, wird kaum zutreffender sein. Bisher schlugen alle Versuche, Hydroxylgruppen nachzuweisen, fehl; allerdings verharzte die Säure dabei. Das Analysenergebniss ist schon im Ber. 32, 678, mitgetheilt.

Dieses neue Präparat erwies sich also als völlig rein, während die Analysen der früher dargestellten Präparate nur unscharfe Werthe ergeben hatten.

Der Körper $C_8H_8O_5$ ist nun, wie schon hervorgehoben wurde,¹⁾ scharf durch das Verhalten mancher Salze charakterisirt. Wird eine in der Kälte hergestellte wässrige Lösung des Kupfer- oder Calciumsalzes erhitzt, so findet fast quantitativer Ausfall der betreffenden Salze statt.²⁾ Und zwar hat das ausfallende Calciumsalz einen ziemlich constanten Gehalt an Calcium, der in der Mitte zwischen dem für das neutrale Salz und dem für das einfach saure Salz berechneten liegt und etwa zwischen 20 und 21 % schwankt.³⁾

Man kann es sich auf folgende Weise entstanden denken:
 $4 C_8H_8O_5 + 5 CaCO_3 = 5 CO_2 + (C_{32}H_{32}Ca_5O_{22} + H_2O) + H_2O^{4)}$

Dieses Salz hat meist die Form von rundlichen Körnern, selten wird es in kleinen Nadeln erhalten.

Aus obigem Präparat hergestellte Calciumsalze ergaben z. B. folgende Resultate:

1. 0,6741 g, im Vacuum getrocknet, verloren bei 105° 0,0137 g und hinterliessen 0,1976 g CaO (nachdem das Ca als Oxalat gefällt war).
2. 0,2661 g gaben 0,004 g H_2O ab und hinterliessen 0,0756 g CaO.
3. 0,1673 g (in Nadeln krystallisirend) verloren bei 110° 0,0021 g und gaben 0,0465 g CaO.

Berechnet für		Gefunden		
$C_{32}H_{32}Ca_5O_{22} + H_2O$		1.	2.	3.
% H_2O	1,80	2,03	1,50	1,25
% Ca	20,41	21,36	20,6	20,22

Für das Silbersalz des Körpers $C_8H_8O_5$ waren früher Werthe gefunden worden, welche nur annähernd mit der Formel $C_8H_7Ag_3O_6$ übereinstimmten. Nun wurde auch aus dem neuen Präparat das Silbersalz bereitet und bei der zweiten Analyse zeigte sich, dass das im Vacuum scharf getrocknete Salz bei

1) l. c. S. 46. Ber. 32. 678.

2) Einmal wurde ein Ausfall schon beim Stehen an der Luft beobachtet; 0,4075 g dieses Salzes verloren bei 110° 0,0058 g und gaben 0,1122 g CaO oder 1,42 % H_2O und 19,95 % Ca.

3) $(C_8H_7O_6)_2 Ca_3$ verlangt 23,16 % Ca, $C_8H_8O_6 Ca$ 16,67 % Ca.

4) Es scheint mir von Interesse zu sein, dass sich hier ein Körper bildet, der wie das Hämatin selbst 32 Atome Kohlenstoff enthält.

110° eine Gewichtsabnahme erfuhr, ohne sich zu bräunen; aus derselben kann auf einen Gehalt von $\frac{1}{2}$ H₂O geschlossen werden, welcher die Differenzen von ehemals erklärt.

1. 1,3980 g im Vacuum getrocknet gaben 0,9797 g Ag₂S.

2. 0,4448 g verloren bei 110° 0,0065 g und gaben 0,3082 g Ag₂S.

Berechnet für C ₈ H ₇ Ag ₂ O ₆ + $\frac{1}{2}$ H ₂ O			Gefunden	
%	$\frac{1}{2}$ H ₂ O		1.	2.
%	Ag	1,69	—	1,46
		60,83	61,04	61,24

Der bei der Aufarbeitung der Rohsäure erhaltene Syrup hatte, wie erwähnt, ein beim Erhitzen unlöslich werdendes Kalksalz im Gewichte von 1,8 g ergeben; auch dieses erwies sich als ein Derivat von C₈H₈O₅, wie aus folgenden Analysen hervorgeht.

1. 1,8334 g bei 110° getrocknetes Calciumsalz gaben 0,5281 g CaO = 20,58% Ca.

2. Die hieraus regenerirte Säure war nur schwierig krystallisirt zu erhalten. 0,1433 g gaben 0,2710 g CO₂ und 0,0627 g H₂O, d. h. 51,57% C und 4,86% H, also etwas unscharfe Werthe.

Hier möchte ich noch die folgende Beobachtung einschalten. Der Körper C₈H₈O₅ löst sich in ca. 26 Theilen kalten, in 5 Theilen warmen Wassers, aus welcher letzterer Lösung er daher beim Einstellen in kaltes Wasser sofort in prächtigen Krystallen von Wetzsteinform anschiesst. Ist aber die wässerige Lösung über 80° erhitzt worden, so scheiden sich beim Erkalten keine Krystalle, sondern Oeltröpfchen aus, welche nach einiger Zeit eine strahlige Krystallmasse geben. Löst man diese sofort in der fünffachen Wassermenge, so bildet sich beim Erkalten wieder ein Oel, löst man erst nach Verlauf mehrerer Stunden, so erhält man unter genau gleichen Bedingungen die prächtigen Krystalle zurück. Niemals entstand aber das Oel, sobald nicht über 80° erhitzt worden war.

Bei der Aufarbeitung der Rohsäure waren schliesslich noch ca. 0,4 g eines Kalksalzes erhalten worden, das in Nadeln krystallisirte und wasserlöslich war. Hier dürfte ein Salz der »zweibasischen Hämatinsäure« C₈H₉NO₄ vorliegen.

0,4211 g vacuumtrockenes Salz verloren bei 110° 0,0197 g und gaben 0,0545 g CaO.

Berechnet für $(C_8H_8NO)_2 Ca + 1 H_2O$	Gefunden
% 1 H_2O 4,27	4,65
% Ca 9,90	9,69

Bei diesem Versuche bestand also die Hauptmenge der ätherlöslichen Säure aus $C_8H_8O_5$. Der grösste Theil des Hämatins war aber in den eingangs aufgeführten Körper A übergegangen, der sich beim Verjagen der freien Essigsäure unlöslich abscheidet. Diesem haften trotz guten Auswaschens noch beträchtliche Mengen von Hämatinsäure an, welche beim Lösen von A in Soda und Fällen mit Schwefelsäure in Lösung bleiben und nun ausgeäthert werden können. Auch dieser Theil der Säure bestand im Wesentlichen aus $C_8H_8O_5$; denn nach Herstellung der Kalksalzlösung entstand beim Erhitzen ein Ausfall, welcher mehr als 1 g wog, während das Filtrat davon beim Eindampfen nur geringe Mengen Salz hinterliess.

0,1065 g des ersteren gaben 0,0315 g $CaO = 21,13\%$ Ca, welcher Werth mit dem früher gefundenen gut übereinstimmt.

Der durch Schwefelsäure aus seiner alkalischen Lösung wieder gefällte Körper A wurde nach sorgfältigem Auswaschen und Trocknen analysirt, lediglich um ungefähr einen Einblick in die Veränderungen zu bekommen, welche durch die Oxydation bewirkt worden war.

1. 0,2277 g gaben 0,4994 g CO_2 , 0,1085 g H_2O und 0,0097 g Asche = 59,81 % C. und 5,29 % H.

2. 0,767 g gaben 66,3 ccm. N. bei 739,5 mm B. und 4,5° C. = 10,30 % N.

Wie zu erwarten, war also der procentische Gehalt an Kohlenstoff geringer geworden; bemerkenswerth ist aber vor Allem, dass sich die Asche als in Salzsäure unlöslich erwies, was einem bedeutenden Gehalt an Chrom zuzuschreiben ist.

Leider löste sich A, weder getrocknet noch frisch gefällt, in Eisessig, so dass die weitere Oxydation in alkalischer Lösung ausgeführt werden musste. Als Oxydationsmittel wurde Kaliumpermanganat gewählt und so viel einer 4,4 % igen Lösung desselben verwendet, als etwa zwei Atomen Sauerstoff entspricht, unter der Annahme, das Molekulargewicht von A differire nicht allzuviel von dem des Hämatins. Zur Vollendung der Oxydation

musste auf dem Wasserbade erwärmt werden. Nachdem dann vom Manganschlamm getrennt und das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert worden war, wurde der hierdurch entstehende Niederschlag (Körper B) abfiltrirt. Das Filtrat wurde eingedampft, von einer harzigen Masse abfiltrirt und ausgeäthert.

Der Aether hinterliess 0,5 g Krystalle neben einem Syrup, welcher wie angegeben in die Kalksalze übergeführt wurde. Auch hier bildete sich beim Erhitzen ein Niederschlag (ca. 1 g), das Filtrat davon hinterliess amorphe Calciumsalze, aus denen einheitliche Produkte nicht erhalten werden konnten.

Die 0,5 g in Krystallen erhaltene Säure bestanden aus $C_8H_8O_5$, wie schon das Verhalten des Kalksalzes lehrte und die Analyse bestätigte.

Bei derselben gaben 0,5914 g, bei 110° getrocknet, 0,1763 g $CaO = 21,38\%$ Ca.

Und die bei dieser Analyse regenerirte Säure gab ein Silbersalz, dessen Silbergehalt völlig der Formel $C_8H_7Ag_3O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ entsprach. 0,7927 g, im Vacuum getrocknet, verloren bei 110° 0,0158 g (unter geringer Braunfärbung) und gaben 0,5516 g Ag_2S .

Berechnet $C_8H_7Ag_3O_6 + \frac{1}{2} H_2O$	Gefunden:
% H_2O 1,69	1,99
% Ag 60,83	60,60

Es hatte also die weitere Oxydation von A durch Kaliumpermanganat weitere Mengen vom Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure geliefert. Daneben war ein nur in Alkalien löslicher Körper (B) entstanden, dessen Analyse ich noch anfügen will.

1. 0,3058 g gaben 0,6633 g CO_2 , 0,1373 g H_2O und 0,0114 g Asche.
2. 0,1967 g gaben 17 ccm. N. bei 735 mm B. und 6,3°.

Die Asche war völlig löslich in HCl und lieferte dann 0,0114 g Fe_2O_3 . Aus obigen Werthen berechnet sich: 59,15% C, 4,99% H, 10,15% N und 2,61% Fe. Durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat war also das Chrom von A wieder herausgenommen worden.

Bei dem beschriebenen Versuche bestand — aus welchem Grunde kann ich nicht sicher angeben — die Hauptmenge der ätherlöslichen Säure aus $C_8H_8O_5$, und das grosse Krystallisations-

vermögen dieses Körpers ermöglichte die Abscheidung eines Theils desselben durch Umkrystallisation aus heissem Wasser. Wie ich aber schon zeigte, ist $C_8H_8O_3$ nicht als primäres Oxydationsprodukt anzusehen, als solches trat vielmehr in der Mehrzahl der Versuche, bei welchen das Oxydationsmittel in einer 12 Atomen Sauerstoff pro Hämatinmolekül entsprechenden Menge verwendet wurde, die «zweibasische Hämatinsäure $C_8H_8NO_4$ » auf, welche aus dem Gemisch der Rohprodukte schwerer krystallisirt. Dann ist nun ein Trennungsvorverfahren am Platze, das sich im Wesentlichen eng an das bereits angegebene anschliesst, in einigen Punkten aber abweicht, nachdem im Laufe der Zeit einige Beobachtungen gemacht worden waren, die eine Modification der Methoden mit sich brachten. Auf diese muss ich eingehender zurückkommen.

b. Zunächst möchte ich hervorheben, dass es bei Verwendung von 12 Atomen Sauerstoff rathsam ist, alle Operationen bei möglichst niedriger Temperatur auszuführen; es ist dann auch schon das Rohprodukt bedeutend reiner und leichter krystallisirt zu erhalten. So kann der durch Fällung einer alkalischen Lösung mittelst einer Säure erhaltene äusserst voluminöse Hämatinschlamm auch in kaltem Eisessig gelöst werden, wenn man denselben unter häufigem Rühren ca. 24 Stunden lang einwirken lässt. Die Oxydation kann (wie erwähnt) bei Zimmertemperatur zu Ende gebracht werden, sobald man wochenlang stehen lässt, doch ist auch Erwärmen auf ca. 50° nicht schädlich und hat den grossen Vortheil, dass die Reaction in einem Tage beendet ist. Schliesslich wird der Eisessig am besten im Vacuum abdestillirt, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen und dann bis zur Reinigung des Rohprodukts wie früher angegeben verfahren. Die Rohsäure wird dann in Natriumcarbonat gelöst, die alkalische Lösung mit Aether extrahirt, darauf wieder angesäuert. Bei grösseren Mengen tritt hierbei eine Trübung ein, welche sich in ca. einem Tage absetzt, worauf die abgegossene klare Lösung ausgeäthert wird. Die nach Abdestillation des Aethers erhaltene Säure wird nun am besten in Wasser gelöst und diese Lösung von Neuem ausgeäthert, wobei manchmal kleine Mengen einer in

anderer Form krystallisirenden Säure zurückbleiben, welche nur aus freie Schwefelsäure haltenden Lösungen ausgeäthert werden kann¹⁾. Nun erst wird zur Darstellung der Kalksalze geschritten; bevor jedoch die Lösung derselben erwärmt wird,²⁾ ist es nöthig, sie mit Aether zu extrahiren, um etwa noch vorhandene freie Säure³⁾ zu entfernen, denn solche kann sowohl das Ausfallen des Kalksalzes von $C_8H_8O_5$ verhindern, wie auch die Löslichkeit des Kalksalzes von $C_8H_8NO_4$ so erhöhen, dass ein Umkrystallisiren aus der 3—4 fachen Menge heissen Wassers nicht mehr möglich ist.

Hat man aber alle erwähnten Massnahmen getroffen, so gelingt die Abscheidung von $C_8H_8O_5$ als Kalksalz gut. Die Analysen solcher Kalksalze zeigten den erwarteten Calciumgehalt, z. B.:

1. 0,5451 g bei 105° getrocknet gaben 0,1563 g CaO = 20,47% Ca.
2. 0,9375 g, vacuumtrocken, verloren bei 130° 0,017 g und gaben 0,2654 g CaO oder 1,81% H_2O und 20,59% Ca.

Das hieraus gewonnene Silbersalz zeigte den berechneten Silbergehalt:

0,4983 g, bei 120° $\frac{1}{2}$ Stunde getrocknet, gaben 0,3527 g Ag_2S = 61,65% Ag (ber. 61,8 für $C_8H_7Ag_2O_6$).

Die regenerirte Säure zeigte den richtigen Schmelzpunkt. Doch ist häufig nur wenig $C_8H_8O_5$ vorhanden, manchmal fehlte sogar diese Säure ganz.

Das Filtrat von obigem Salz wird am besten nochmals mit Calciumcarbonat behandelt und wiederum schwach erhitzt. Sobald kein Ausfall mehr dabei entsteht, wird die Lösung im Vacuum bei gewöhnlicher Temperatur eingedunstet, Erhitzen bringt — selbst wenn es im Vacuum geschieht — stets grosse Zersetzung hervor. Das trockene Kalksalz, welches meist bereits schön krystallisirt, wird dann, wie angegeben, aus Wasser um-

1) cf. Ostwald, die wissenschaftlichen Grundlagen der analytischen Chemie, S. 84.

2) Zu starkes und langes Erhitzen ist thunlichst zu vermeiden, hierbei färbt sich die Lösung stark, während ein eigenthümlicher nicht unangenehmer Geruch auftritt.

3) Diese dürfte mit $C_8H_8NO_4$ identisch sein, $C_8H_8O_5$ fand sich bisher nicht unter diesen Theilen.

krystallisirt, wobei regelmässig kleine Mengen unlöslich bleiben.¹⁾ Die Mutterlaugen gaben bei gleicher Behandlung stets noch weitere Mengen aus heissem Wasser krystallisirenden Salzes.

Analysen der so gewonnenen Kalksalze gaben z. B. folgende Resultate:

1. 0,4943 g, bei 105° getrocknet, gaben 0,0654 g CaO.
2. 0,3010 „ „ 100° „ „ 0,0343 „ CaO.
3. 0,3182 „, vacuumtrocken, verloren bei 110° 0,0125 g und gaben 0,0413 g CaO.

Berechnet		Gefunden		
für $(C_6H_5NO_2)_2Ca + 1H_2O$		1	2	3
% H_2O	4,27	—	—	3,93
% Ca	9,90	9,47	9,39	9,71.

Die aus dem umkrystallisirten Kalksalze wiedergewonnene Säure zeigte bei verschiedenen Präparaten keinen ganz scharfen Schmelzpunkt, er wurde bei 111 bis 113°, 110 bis 113°, 111,5 bis 112,5° beobachtet, nachdem von 103° ab ein Erweichen stattgefunden hatte.

Bei der Analyse gaben 0,2010 g : 0,3867 g CO_2 und 0,0935 g H_2O .

Berechnet für $C_6H_5NO_2$		Gefunden
% C	52,45	52,47
% H	4,92	5,16

Was nun die übrigen Spaltungsprodukte des Hämatins betrifft, die bei der Oxydation mit 12 Atomen Sauerstoff entstehen, so konnten zunächst Kohlendioxyd und Ammoniak nachgewiesen werden.

Die Menge des ersteren wurde nach demselben Verfahren ermittelt, wie es später auch bei der Oxydation des Gallenfarbstoffs zur Anwendung kam.²⁾

5 g Hämatin, enthaltend 3,243 g Kohlenstoff lieferten:

1. 0,212 g CO_2 = 0,0577 g C, d. h. c. 1/20 des Kohlenstoffs.³⁾

1) Wird aus diesen Antheilen die Säure wieder hergestellt und diese von Neuem ins Kalksalz übergeführt, so entsteht beim Erhitzen der Lösung ein Ausfall, also spaltet das Kalksalz von $C_6H_5NO_2$ schon im Vacuum unter Schwefelsäure Ammoniak ab.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. XXVI, S. 324.

3) Dieser Versuch wurde von Herrn Völter ausgeführt, der die entwickelte CO_2 in Natronkalk auffing.

2. 0,2904 g CO_2 = 0,08 g C, d. h. c. $\frac{1}{10}$ des Kohlenstoffs.

3. 0,2244 „ „ = 0,0612 „ „ „ „ „ $\frac{1}{33}$ „ „

Zur Untersuchung auf flüchtige organische Basen wurde, nachdem die Hämatinsäuren mittelst Aether extrahirt waren, die schwefelsaure Lösung mit Natronlauge, resp. Barythydrat alkalisch gemacht, darauf mit Wasserdämpfen destillirt und das Uebergehende in Salzsäure aufgefangen. Aus dem durch Eindampfen gewonnenen Salz wurde von Herrn Kölle die Platinchloriddoppelverbindung hergestellt und analysirt.

1. 0,2665 g gaben 0,117 g Platin = 43,90% Pt.

Es lag also lediglich Platinsalmiak vor, welcher 43,92% Pt verlangt. Nun wurde auch die Menge des gebildeten Ammoniaks¹⁾ bestimmt, indem bis zum Aufhören der alkalischen Reaction des Uebergehenden destillirt und das Gewicht des erhaltenen Salmiaks bestimmt wurde. 5 g Hämatin, enthaltend 0,473 g Stickstoff, lieferten:

1) 0,25 g NH_4Cl = 0,0655 g N, d. h. c. $\frac{1}{7}$ des vorhandenen N.

2) 0,7 „ „ = 0,183 „ „ „ „ „ $\frac{3}{7}$ „ „ „

3) 0,25 „ „ = 0,0655 „ „ „ „ „ $\frac{1}{7}$ „ „ „

4) 0,16 „ „ = 0,042 „ „ „ „ „ $\frac{1}{11}$ „ „ „

Die Mengen des als Ammoniak abgespaltenen Stickstoffs differiren also ganz wesentlich und sind, trotzdem ja diese Bestimmungen nur annähernd richtig sein können, wohl kaum auf Versuchsfehler zurückzuführen. Doch habe ich den Grund dieses verschiedenen Verhaltens noch nicht feststellen können.

Dass alle Versuche, weitere organische Spaltungsprodukte basischer oder saurer Natur zu fassen, negative Resultate gaben, habe ich schon erwähnt; so wurden namentlich auch keine flüchtigen, reducirend wirkenden Körper beobachtet, die beim Abdestilliren des zur Lösung dienenden Eisessigs hätten mit übergehen können.

Neben den ätherlöslichen Säuren, auf welche ich in einer späteren Abhandlung noch zurückzukommen gedenke, konnte somit nur der eisenhaltige Körper als ein Produkt der Oxydation des Hämatins gewonnen werden, welcher sich unlöslich ab-

¹⁾ Sämmtliche Materialien waren auf Ammoniak vorher geprüft und als rein davon befunden worden.

scheidet, sobald die gesammte freie Essigsäure entfernt worden ist. Nach den beim ersten Versuch gewonnenen Erfahrungen muss dieser Körper zunächst sehr lange, am besten mit schwefelsäurehaltigem Wasser, ausgewaschen werden, damit nicht noch Hämatinsäure von ihm zurückgehalten wird. Er löst sich gewöhnlich bis auf Spuren anorganischer Substanz, die Eisen enthält, in Soda auf und kann aus dieser Lösung durch Schwefelsäure gefällt werden. Nach vollkommenem Auswaschen und Trocknen wurden einige Analysen gemacht, um einen Einblick in seine procentische Zusammensetzung zu erhalten. Hierbei zeigten sich bei Präparaten verschiedener Darstellung ausserordentliche Differenzen, namentlich bedingt durch Unterschiede im Aschengehalt. Und auch hier fand sich, neben Eisen, Chrom in der Asche vor, und durch Salzsäure erfolgte keine Lösung derselben.

1. 0,3047 g gaben 0,5308 g CO_2 , 0,1325 g H_2O u. 0,0535 g Asche.
2. 0,1946 „ „ 0,3228 „ „ 0,0908 „ „ 0,0327 „ „
3. 0,3329 „ „ 0,4921 „ „ 0,1311 „ „ 0,0875 „ „
4. 0,2878 „ „ 22,9 ccm. N bei 737 B und 15,5°.

Her Kölle fand dagegen folgende Werthe:

5. 0,305 g gaben 0,6055 g CO_2 , 0,150 g H_2O u. 0,025 g Asche.
6. 0,2135 „ „ 17,4 ccm. N bei 714 mm. B. und 18°.

Aus diesen Analysen ergaben sich nun folgende procentische Werthe:

	1	2	3	4	5	6
% C	47,51	44,79	40,32	—	54,14	—
% H	4,83	5,18	4,38	—	5,96	—
% N	—	—	—	9,01	—	8,81
% Asche	17,56	16,8	26,19	—	8,19	—

Die Analysen 1—4 sind von Präparaten erhalten, bei deren Gewinnung der Eisessig über freiem Feuer abdestillirt wurde, bei 5 und 6 wurde er im Vacuum entfernt. Die höhere Temperatur scheint also einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung dieses Körpers zu haben.

Herr Kölle hat nun denselben einer weiteren Oxydation unterworfen und zwar in alkalischer Lösung durch Kaliumpermanganat, da Eisessig nicht mehr geeignet war.

5 g, in Soda gelöst, wurden bei Zimmertemperatur nach

und nach mit 50 ccm. einer vierprocentigen Lösung des erwähnten Salzes versetzt, welche Menge ungefähr zwei Atomen Sauerstoff auf eine dem Hämatin an Grösse ähnliche Molekel entspricht. Nach zwei Tagen war das Permanganat verbraucht, es wurde vom Manganschläm abfiltrirt, dann das Filtrat mit Schwefelsäure sauer gemacht, wieder filtrirt und das Filtrat ausgeäthert. Der Aether hinterliess schliesslich einen Syrup, der bald krystallisirte. Er wurde, wie früher besprochen, in das Calciumsalz übergeführt, beim Erhitzen der Lösung entstand ein Niederschlag,¹⁾ das Filtrat von demselben enthielt nur noch geringe Mengen Calciumsalz.

0,0695 g des ausgefallenen Kalksalzes gaben dann 0,020 g $\text{CaO} = 20,57\%$ Ca, welcher Werth ja sehr gut mit den früher gefundenen übereinstimmt.

Durch weitere Oxydation lieferte also auch dieser Körper nochmals allerdings nur sehr geringe Mengen von $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$. Was sich sonst noch bildet, wird die weitere Untersuchung lehren.

c. Die Oxydation mit einer 20—22 Atomen Sauerstoff entsprechenden Menge des Chromats kann nur bei 2—3tägigem Stehen im siedenden Wasserbade zu Ende geführt werden. Hierbei entwickeln sich nun reichliche Mengen von Kohlendioxyd, die bei 2 Versuchen bestimmt wurden.²⁾

1. Zum Lösen des erhaltenen Baryumcarbonats waren nöthig 42,6 ccm. Normal · HCl.

2. Zum Lösen des erhaltenen Baryumcarbonats waren nöthig 50 ccm. Normal · HCl, das entspricht aber 0,2556 g resp. 0,3 g C, und da jedes Mal 5 g Ht mit 3,24 g C zur Verwendung kamen, 8 resp. 9,2% vom vorhandenen Kohlenstoff.³⁾

Die Menge des auftretenden Ammoniaks wechselt wie bei den Versuchen mit 12 Atomen Sauerstoff.

1) Hier bekam z. B. Herr Kölle zunächst keinen Ausfall beim Erhitzen der Kalksalzlösung, erst nachdem er die Säure regenerirt und von Neuem die Kalksalze dargestellt hatte, stellte sich die beschriebene Reaction ein, wahrscheinlich war das erste Mal Säure als solche noch vorhanden und verhinderte das Entstehen des Niederschlags.

2) Die Methode blieb dieselbe wie auf S. 24 angegeben.

3) Im ersten Falle war die Chromsäure bei Beendigung des Versuchs noch nicht völlig verbraucht.

1. 5 g Ht gaben ca. 0,5 g NH_4Cl = 27,5% des vorhandenen Stickstoffs
2. 5 „ „ „ 0,7 „ = 38,7% „ „ „
3. 5 „ „ „ 0,2 „ = 11 % „ „ „
4. 5 „ „ „ 0,46 „ = 25,2% „ „ „
5. 5 „ „ „ 0,47 „ = 25,3% „ „ „

Bei den beiden letzten Versuchen war die alkalische Lösung des Hämatins (vor der Oxydation) mehrere Stunden erhitzt worden, bei Versuch 3 war das Hämatin in der Kälte bereitet worden.

Der eisenhaltige, nur in Alkalien lösliche Körper, dessen Menge bei 12 Atomen Sauerstoff noch 40% vom verwendeten Hämatin ausmacht, verschwindet jetzt fast vollständig.

Dagegen wird die Ausbeute an ätherlöslichen Produkten etwas besser, erhalten wurden z. B.:

1. Aus 10 g Hämatin : 4,8 g = 48 %
 2. „ 5 „ „ : 2,1 „ = 42 %
 3. „ 15 „ „ : 7,1 „ = 47,5 %
- } des verwendeten Hämatins.

Und diese bestehen nun auch noch zum grössten Theile aus den Hämatinsäuren, und zwar ist $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_6$ manchmal nur in ganz geringen, manchmal in recht bedeutenden Mengen vorhanden. Der Rest ist dann $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4$, abgesehen von dem Antheil, der beim Umkrystallisiren der löslichen Kalksalze aus heissem Wasser schliesslich in den Mutterlaugen verbleibt. Bei der Analyse der beim Erkalten ausfallenden Antheile, die abgesaugt und mit kaltem Wasser nachgewaschen sind, ergaben sich z. B. folgende Resultate:

1. 0,3326 g über H_2SO_4 getrocknet verloren bei 100° 0,0103 g und gaben 0,0423 g CaO.
2. 0,1664 g über H_2SO_4 getrocknet verloren im Vacuum nicht an Gewicht, bei 100° 0,0094 g und gaben 0,0219 g CaO.
3. 0,1294 g aus der Mutterlauge vom vorigen Salz gewonnen und einmal umkrystallisirt, verloren im Vacuum nichts, bei 105° 0,0065 g und gaben 0,0175 g CaO.

Berechnet für:			Gefunden:		
$(\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4)_2\text{Ca} + \text{H}_2\text{O}$			I.	II.	III.
%	H_2O	4,27	3,09	5,35	5,02
%	Ca	9,90	9,38	9,87	9,66

Trotzdem nun der Wassergehalt recht erheblich differirt, glaube ich doch, dass es sich um einheitliches Material handelt.

Aus den vereinten Kalksalzen wurde die Säure wieder hergestellt und aus Essigester umkrystallisirt, sie zeigte dann den Schmelzpunkt : 114—116° bei langsamem Erhitzen, bei rascherem 110—111°.

Die Theile der Spaltungsprodukte, welche bei der Reinigung der Säuren aus alkalischer Lösung in den Aether gehen, konnten bisher nur als harzartige Masse erhalten werden. Die Verarbeitung der nach dem Abblasen des Ammoniaks verbleibenden Flüssigkeit auf organische Körper lieferte nur Spuren einer stickstofffreien, stark hygroskopischen Masse.

B. Oxydation des Hämatins in alkalischer Lösung.

1. Durch Ferricyankalium.

Bei den bisher beschriebenen Versuchen war das Hämatin etwa in der 60fachen Menge Eisessigs gelöst worden, um oxydirt werden zu können. Nun war es ja nicht unmöglich, dass auch saure, flüchtige Spaltungsprodukte bei dieser Oxydation auftreten. Solche nachzuweisen, glückte, wie erwähnt, nicht, doch machte der grosse Ueberschuss an Essigsäure einen Erfolg in dieser Hinsicht von vornherein zweifelhaft. Es erschien daher angebracht, die Oxydation des Hämatins auch einmal in alkalischer Lösung zu prüfen, und zunächst wurde zu diesem Zwecke ein schwaches Oxydationsmittel, das Ferricyankalium, gewählt.

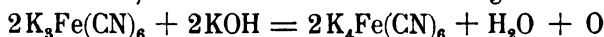
Herr Kölle liess in Form dieses Salzes 8 Atome Sauerstoff einwirken, indem 5 g Hämatin in starker Kalilauge gelöst — es wurden 22 g KOH verwendet — und nun im Laufe eines Tages 44 g Ferricyankalium in wässriger Lösung eingetragen wurden. Zur Beendigung der Reaction wurde noch 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, dann gab eine herausgenommene Probe mit HNO_3 angesäuert und filtrirt mit Silbernitrat einen rein weissen Niederschlag — das Ferrisalz war verbraucht. Jetzt wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis der Geruch nach Blausäure verschwunden war. Hierbei entsteht ein dunkel gefärbter Niederschlag (F), welcher abgesaugt wurde. Das

erhaltene Filtrat kam zur Ausätherung, der ätherische Auszug hinterliess 1,2 g eines gelben Syrups, der allmählich Krystalle absetzte. Auch hier gelang es, durch das Kalksalz den Nachweis zu führen, dass dreibasische Hämatinsäure vorliegt. Das beim Erhitzen ausfallende Kalksalz gab nämlich die folgenden Werthe: 0,824 g lieferten 0,230 g CaO = 19,9% Ca.

Der durch Schwefelsäure gefällte Körper F wurde nun abermals in Kalilauge gelöst und mit der gleichen Menge Ferricyankalium, wie Anfangs, versetzt; auch diese wurden verbraucht. Auf gleiche Weise, wie oben geschildert, gelang es, ein beim Erhitzen ausfallendes Kalksalz mit 20,41% Ca zu erhalten (0,828 g gaben 0,239 g CaO).

Nach diesen Versuchen scheinen sich also entweder bei der erneuten Einwirkung wieder Complexe vom Reste des Hämatinmoleküls loszulösen, welche durch Ferricyankalium zu $C_8H_5O_5$ oxydirt werden, oder es bleibt bei der ersten Oxydation überhaupt ein Theil des Hämatins unverändert, und dieser wird erst von der zweiten Portion des Oxydationsmittels angegriffen.

Aehnlich gestalten sich die Verhältnisse, wenn von vornherein 12 Atome Sauerstoff zur Einwirkung kommen; ich möchte erwähnen, dass die nach der Gleichung



berechnete Menge Kalihydrat nicht genügt, sondern dass mindestens die doppelte Menge verwendet werden muss. Dann vollzieht sich aber die Oxydation sehr rasch, und es scheidet sich aus der alkalischen Flüssigkeit ein Niederschlag ab, der anorganischer Natur ist und wohl aus Eisenoxyd besteht. Die von diesem abfiltrirte Flüssigkeit wurde nun mit Schwefelsäure angesäuert, der starke Niederschlag (F') filtrirt, das nach Blausäure riechende Filtrat mit Wasserdämpfen destillirt, das Destillat nach Behandlung mit Calciumcarbonat auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand mit Schwefelsäure angesäuert und von Neuem mit Wasserdampf destillirt, wobei aber das Uebergehen eines sauer reagirenden Körpers nicht beobachtet werden konnte.

Die nach dem Verjagen der Blausäure zurückbleibende

Flüssigkeit wurde nun ausgeäthert und schliesslich 0,75 g ätherlösliche Säure erhalten, welche, wie gewöhnlich, in das Kalksalz übergeführt wurde. Beim Erhitzen der Lösung desselben entstand ein kleiner Niederschlag, 0,2668 g desselben gaben 0,0765 g $\text{CaO} = 20,48\%$ Ca. Die regenerirte Säure krystallisirte sofort, schied sich dann beim Umkrystallisiren aus heissem Wasser als Oel ab, das aber beim Berühren mit einem Krystall von $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ momentan krystallisirte.

Der zuerst durch Schwefelsäure gefällte Körper F' lieferte endlich bei weiterer Oxydation ganz geringe Mengen ätherlöslicher Produkte, unter denen $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ wiederum enthalten ist, da ein beim Erhitzen der kalten Lösung ausfallendes Ca-Salz mit allerdings nur 19,14% Ca erhalten wurde. (0,0821 g gaben 0,0220 g CaO .)

2. Durch Ammoniumpersulfat.

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass Ammoniumpersulfat in stark alkalischer Lösung auf Hämatin einwirkt und dass die Oxydation bis zur fast völligen Entfärbung geführt werden kann, wurden 25 g Hämatin, aus nach Nencki's Methode dargestellten Hämin erhalten, in Portionen von 5 g verarbeitet. Die Oxydation wurde durch Erwärmen auf dem Wasserbade unterstützt, die Reaction stets alkalisch gehalten, so dass sich beständig Ammoniak entwickelte. Nach Verbrauch von ca. 20 Atomen Sauerstoff, auf die Molekel Hämatin berechnet, war die alkalische Flüssigkeit nur noch hellbraun gefärbt, und es hatte sich ein Niederschlag abgeschieden, von welchem abfiltrirt wurde. Er erwies sich als ganz anorganisch und bestand aus Eisenoxyd. Das Filtrat wurde eingeeengt, mit Schwefelsäure sauer gemacht und mit Wasserdämpfen destillirt; das Destillat durch Soda alkalisch gemacht, darauf eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt. Nach Abdestilliren desselben blieb ein weisses Salz, welches etwa wie Buttersäure roch. Bei einem zweiten Versuch mit 20 g nach Schalfjew's Vorschrift bereiteten Hämatin wurden dagegen flüchtige Säuren nur in Spuren aufgefunden. Das beim ersten Versuche erhaltene Salz entstammt daher wohl dem

Isoamylalkohol, der einst zur Extraction des Hämins gedient hatte und bekanntlich sehr schwer zu entfernen ist.¹⁾

Die sauren Flüssigkeiten wurden nun ausgeäthert und gaben 2 resp. 3 g ätherlösliche Produkte, welche zunächst amorph waren, nach einiger Zeit aber mit Krystallen durchsetzt erschienen. Die vereinte Menge wurde im Wasser gelöst, darauf einen Tag lang mit Calciumcarbonat in der Kälte behandelt, filtrirt und das Filtrat wieder ausgeäthert.

Die Lösung der Kalksalze gab beim Erhitzen keinen Ausfall — $C_8H_8O_5$ ist also nicht vorhanden — beim Stehen im Vacuum bildete sich ein dicker Syrup, der noch nicht näher untersucht ist.

Die ätherische Lösung hinterliess einen Rückstand, der zwar bald krystallisirte, doch zum Mindesten, nach der Form der Krystalle zu urtheilen, aus 2 Säuren bestand. Die wässerige Lösung derselben wurde nun mit Chloroform ausgeschüttelt, in das bis jetzt nicht krystallisirte Theile übergehen, die wässerige Lösung gab nach dem Verdunsten des Wassers einheitlichere Krystalle, die nunmehr auf einem Thonteller getrocknet und dann aus heissem Essigester umkrystallisirt wurden. Nach dem Absaugen und Nachwaschen mit Essigester zeigten sie den Schmelzpunkt $180-181^\circ$, wobei geringe Zersetzung eintrat. Beim Erhitzen auf dem Platinblech traten heftig zum Husten reizende Produkte auf.

Die Lösung des Ammoniaksalzes gab mit Chlorbaryum einen Niederschlag, desgleichen, wenn nach dem Versetzen mit Ferrichlorid zum Sieden erhitzt wurde. In Soda gelöst erfolgte Entfärbung von Kaliumpermanganat erst nach einigen Stunden. Es liegt also wohl Bernsteinsäure vor.

Allerdings gab die Analyse des Silbersalzes keinen scharf stimmenden Werth:

0,2691 g vacuumtrocken gaben 0,2257 g $AgCl = 63,2\%$ Ag.

¹⁾ So erhielt Herr Kölle, als er den Eisessig im Vacuum abdestillirte, welcher zum Lösen des Hämatins gedient hatte, unter den zuerst übergehenden Theilen den am charakteristischen Geruch leicht erkennbaren essigsauren Amylester.

Auch nachdem die regenerirte Säure aus 4 Theilen heisser Salpetersäure umkrystallisirt war, wurde ein nicht viel besseres Resultat erhalten ¹⁾:

0,0932 g gaben 0,0787 g AgCl.	
Berechnet für: $C_4H_4Ag_2O_2$	Gefunden:
% Ag 65,06.	63,6.

Bei dieser sehr energischen Oxydation des Hämatins verschwinden also die Hämatinsäuren völlig aus der Reactionsmasse. Ob sie es sind, die bei weiterer Oxydation Bernstein-säure liefern, oder ob letztere ein Spaltungsprodukt der Hämatinhälfte ist, welche in saurer Lösung bisher nicht zu krystallisirenden Körpern abgebaut werden konnte, bleibt weiterer Untersuchung vorbehalten.

Tübingen, am 20. Juni 1899.

¹⁾ Als aber dieses Verfahren noch einmal wiederholt wurde, bekam ich ein Silbersalz mit 65,57% Ag.

(0,0365 g gaben 0,0318 g AgCl).

Ueber Darstellung und Spaltungsprodukte des Hämatoporphyrins.

Von

William Küster und Martin Külle.

(Die Untersuchung wurde im physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen mit Unterstützung aus dem Elizabeth Thompson Science Fund ausgeführt.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Juni 1899.)

Das Hämatoporphyrin Nencki's $C_{16}H_{18}N_2O_3$ gibt bei der Oxydation durch Natriumdichromat, wenn man dieses in einer Menge, die zwölf resp. acht Atomen Sauerstoff entspricht, verwendet, die gleichen ätherlöslichen Spaltungsprodukte wie das Hämatin. Der eine von uns erhielt ¹⁾ einstens die «zweibasische Hämatinsäure» $C_8H_8NO_4$ daraus in sehr reiner Form; der Körper $C_8H_8O_5$ hatte sich nur in Spuren gebildet.

Das Hämatoporphyrin entsteht bekanntlich²⁾ durch Einwirkung von mit Bromwasserstoff gesättigtem Eisessig auf «Hämin». Es wurde nun neuerdings versucht, diese Methode zu modificiren, indem das gleiche Mittel zu einer Lösung von Hämatinschlamm in Eisessig gefügt und die Reaction zum Schluss durch Erwärmen auf dem Wasserbade zu fördern gesucht wurde. Die charakteristische Farbe einer sauren Hämatoporphyrinlösung trat aber nicht auf, gleichwohl war fast das gesammte Eisen herausgenommen worden. Denn als nach dem Verjagen des Bromwasserstoffs der Eisessig durch Erhitzen auf dem Wasserbad völlig entfernt worden

1) Ber. d. d. chem. Ges. 30, 105. 32, 678.

2) Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, 24, 430.

war, blieb ein Rückstand, welchem Wasser Eisenbromid entzog. Der nunmehr gut ausgewaschene Körper löste sich langsam in verdünntem Alkali und wurde aus dieser Lösung durch wenig Schwefelsäure in braunrothen Flocken gefällt.

Die Analyse ergab noch einen Aschengehalt, darunter aber nur Spuren von Eisen.¹⁾

Bei der Darstellung aus 30 g Hämin vom Rind nach Schalfesjew resp. 80 g Hämin nach Nencki wurden neuerdings 25 g rohes Hämatoporphyrin und 2,9 g Nebenprodukt resp. 60 und 10 g erhalten.

Die Oxydation wurde so durchgeführt, wie beim Hämatin angegeben ist.²⁾ Bei Verwendung von zwölf Atomen Sauerstoff gaben 5 g Hämatoporphyrin 0,1496 g $\text{CO}_2 = 0,0408 \text{ g C}$, d. h. etwa $\frac{1}{80}$ vom vorhandenen Kohlenstoff, weiter 0,3 g $\text{NH}_4\text{Cl} = 0,0785 \text{ g N}$ oder $\frac{1}{6}$ vom Stickstoff.

Aus 20 g rohen Hämatoporphyrins wurden endlich 5,8 g ätherlösliche Produkte erhalten, welche bei der Reinigung 2 g $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ und 2 g $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4$ vom Schmelzpunkt 112—113° gaben.

1. 0,1620 g dieser letzteren Säure gaben 0,3120 g CO_2 und 0,0773 g H_2O .

Aus 55 g des rohen Hämatoporphyrins, das in Portionen von 5 g mit einer Menge Natriumdichromat oxydirt wurde, die acht Atomen Sauerstoff entsprach, wurde eine Ausbeute von 25,5 g, also nahezu 50%, an Rohsäure gewonnen. Nur ganz geringe Mengen $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ waren dabei. Das Gewicht der mehrfach gereinigten Säure betrug 18 g.

Sie lieferte ein wasserlösliches Calciumsalz, das zunächst im nicht evacuirten Exsiccator über Schwefelsäure bis zum constanten Gewichte getrocknet wurde. Im Vacuum findet dann kein Wasserverlust statt, wohl aber bei 110°, wie aus folgenden Analysen ersichtlich ist.

0,4920 g Substanz verloren bei vorsichtigem Trocknen bei 110° 0,0120 g Wasser und lieferten 0,0655 g $\text{CaO} = 0,0468 \text{ g Ca}$.

1) Ich gedenke diese Reaction weiter zu verfolgen. W. Küster.

2) Siehe vorstehende Mittheilung.

Berechnet für $(C_8H_9NO_4)_2Ca + \frac{1}{2} H_2O$:

$H_2O = 2,23\%$

$Ca = 9,90\%$ ¹⁾

Gefunden:

2,44%

9,75%¹⁾

Die regenerirte Säure zeigte bei langsamen Erhitzen den Schmelzpunkt 114—116° und gab bei der Analyse folgende Werthe:

2. 0,2250 g lieferten 0,430 g CO_2 und 0,1025 g H_2O .

3. 0,2465 g gaben 16 ccm. Stickstoff bei 10° und 734 mm. B.

Berechnet für $C_8H_9NO_4$:

Gefunden:

	I.	II.	III.
C = 52,45%	52,52%	52,12%	—
H = 4,92%	5,30%	5,06%	—
N = 7,65%	—	—	7,59%

Zur Titration wurden 0,444 g der Säure in 10 ccm. 50%igen Alkohols gelöst; sie verbrauchten 23,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Ammoniak, während sich 24,5 ccm. für eine einbasische Substanz $C_8H_9NO_4$ (Mg 183) berechnen.

Was die Löslichkeit der Säure betrifft, so ergab eine Bestimmung, dass 0,8 Theile derselben sich in 12,8 Theilen reinen Aethers lösen, oder 1 Theil braucht 16 Theile Aether zur Lösung.

Das Ammoniumsalz der Säure fällt als eine hygroskopische, klebende Masse aus, wenn man trockenes Ammoniak in die ätherische Lösung der Säure leitet; sie wird mit wasserfreiem Aether nachgewaschen und im Vacuum unter Schwefelsäure scharf getrocknet. Aus wässriger Lösung krystallisirt das Salz in baumartigen Formen aus.

Bei mehrstündigem Kochen mit Natronlauge verliert dieses Salz 2 Atome Stickstoff.

1. 0,2190 g wurden mit 50 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge 3 $\frac{1}{2}$ Stunden gekocht, das Destillat in 40 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure aufgefangen; zum Zurücktitriren waren 18,8 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge erforderlich, entsprechend 0,02968 g Stickstoff. (Indicator Helianthin.)

2. 0,2545 g wurden mit 50 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge vier Stunden gekocht; 33 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure waren vorgelegt, 8,2 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge zum Zurücktitriren erforderlich, also waren 24,8 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure verbraucht, entsprechend 0,03472 g Stickstoff.

1) Die beiden Werthe sind auf das wasserfreie Salz berechnet, da verschiedene Präparate Differenzen im Wassergehalt zeigten.

cf. die Bemerkung auf Seite 28.

Berechnet für:



N = 14,00 %.

Gefunden:

I.

II.

13,55 %

13,65 %.

Die im Kölbchen zurückgebliebene Substanz erwies sich annähernd als dreibasisch:

Bei 1. waren 18,3 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure zum Zurücktitrieren nöthig, bei 2. 13,8 ccm.

Berechnet für dreibasische Substanz:

1. 35,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge.

2. 41,6 „ „ „

Gefunden:

31,7 ccm.

36,2 „

Nach dem Ansäuern durch Schwefelsäure wurde jetzt die entstandene Säure ausgeäthert, der Aetherrückstand in Wasser gelöst, mit Calciumcarbonat behandelt und filtrirt. Das Filtrat gab beim Erwärmen sofort den charakteristischen Ausfall des Kalksalzes von $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_5$.

Wie zu erwarten, war also auch hier der Uebergang von $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_4$ in $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_5$ durch das Kochen mit Natronlauge bewerkstelligt werden.

Von anderweitigen Spaltungsprodukten entsteht in namhaften Mengen nur noch ein Körper, und zwar bleibt er nach dem Abdestilliren des Eisessigs, der als Lösungsmittel während der Oxydation diente, als in Wasser unlöslicher, brauner Schlamm zurück. Er wurde in Natronlauge aufgenommen und wieder durch verdünnte Schwefelsäure gefällt, wobei er sich gerade wie das Hämatin in sehr voluminöser Form abscheidet. Auch löst er sich in diesem Zustand etwas in der salzhaltigen Flüssigkeit auf und wurde deshalb nach dem Trocknen wieder aufs Filter gebracht und erst jetzt durch Auswaschen völlig von der Schwefelsäure befreit.

Bei Verwendung von zwölf Atomen Sauerstoff wurde ein Körper erhalten, der bei 115° getrocknet und analysirt folgende Zahlen ergab:

1. 0,2250 g Substanz lieferten 0,3777 g CO_2 , 0,0987 g Wasser und 0,0087 g Asche.

2. 0,1558 g Substanz gaben 11,2 ccm. Stickstoff bei 8° und 728 mm. B.

Der bei der Oxydation mit acht Atomen Sauerstoff erhaltene Körper zeigte sich ebenfalls als brauner Schlamm und

nach dem Trocknen als spröde, glänzend schwarze Masse, gab aber bei der Analyse andere Werthe:

3. 0,2248 gr. Substanz lieferten 0,4794 g CO_2 , 0,1020 g H_2O und 0,0070 g Asche.

4. 0,2530 g Substanz gaben 22 ccm. Stickstoff bei 13° und 740 mm. B.

Gefunden:

I.	II.	III.	IV.
C = 49,81 %	—	58,16 %	—
H = 4,87 %	—	5,04 %	—
N = —	8,31 %	—	10,15 %

Merkwürdigerweise ist aber das Verhältniß der Atome C, H und N bei beiden Präparaten fast das gleiche, nur enthält das erste bedeutend mehr Sauerstoff. Die Körper lassen sich nämlich etwa durch die Formeln $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$ und $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ ausdrücken.

In der Asche war natürlich Eisen nicht nachzuweisen. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure erleidet dieser Körper scheinbar keine Veränderung, bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat entstehen geringe Mengen flüchtiger, sowie auch ätherlöslicher Säuren. Es war aber nicht möglich, unter letzteren die Säure $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ aufzufinden.

Der schon erwähnte, bei der Darstellung des Hämatoporphyrins entstehende, oben als

Nebenprodukt

bezeichnete Körper fällt aus, wenn die filtrirte essigsäure Lösung des Hämatoporphyrins in viel Wasser gegossen wird. Es gelang, dasselbe von anhängendem Hämatoporphyrin zu befreien. Zunächst wird in Natronlauge gelöst und mit verdünnter Salzsäure gefällt, dann der Niederschlag so lange mit einprozentiger Salzsäure gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr roth gefärbt war. Es dauert dies wochenlang und wird am besten durch Aufgiessen von vielen Litern und öfteres Decantiren bewirkt. Zum Schluss wird chlorfrei gewaschen, auf dem Filter gesammelt und zuerst im Vacuum, dann bei 110° getrocknet. In diesem Zustand stellt das Nebenprodukt eine dunkel-purpurn glänzende Masse dar.

Seine Analyse gab folgende Werthe:

1. 0,2216 g Substanz lieferten 0,5645 g CO₂ und 0,1245 g H₂O.
Die Asche betrug noch 0,003 = 1,35 %.

2. 0,1820 g Substanz lieferten 0,4560 g CO₂ und 0,1027 g H₂O. Die
Asche betrug 0,002 g = 1,09 %.

1. 0,1935 g Substanz gaben 17 ccm Stickstoff bei 6° und
740 mm. B.

2. 0,260 g Substanz lieferten 22,8 ccm Stickstoff bei 7° und
738 mm. B.

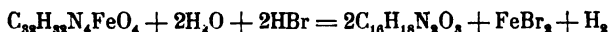
Nach diesen Analysen zu urtheilen, wäre es nicht unmöglich, dass sich ein Körper von der Zusammensetzung C₃₂H₃₆N₄O₅ gebildet hat, der aber noch nicht vollständig gereinigt werden konnte.

Berechnet für: C₃₂H₃₆N₄O₅:

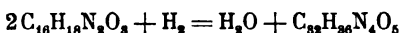
Gefunden: 1)

	I.	II.
C = 69,06 %	70,42 %	69,09 %
H = 6,47 %	6,32 %	6,34 %
N = 10,07 %	10,67 %	10,54 %

Sollten weitere Untersuchungen diese Annahme bestätigen, so wäre der Schluss gestattet, dass der nach der Gleichung



frei werdende Wasserstoff einen Theil des gebildeten Hämatoporphyrins im Sinne folgender Gleichung



umwandelt.

Tübingen, am 20. Juni 1899.

1) Auf aschefreie Substanz berechnet.

Untersuchungen über die Schilddrüse.

Von

Dr. E. Roos,

Privatdocent und 1. Assistent der med. Poliklinik.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medicinischen Facultät in Freiburg i. B.)

(Der Redaction zugegangen am 22. Juni 1899.)

I. Wirksamkeit von Schilddrüsensubstanz verschiedenen Jodgehalts.

Seit der Entdeckung des Jodothyrens ist die Frage nicht zur Ruhe gekommen, ob wir in der jodhaltigen Substanz der Schilddrüse das im Sinne der Schilddrüsentherapie allein wirk-same Moment vor uns haben oder ob sich in der Drüse daneben noch andere Substanzen finden, denen ebenfalls eine Wirksamkeit in dieser Richtung zukommt. Früher wurde von mir schon gezeigt,¹⁾ dass der vom Eiweiss durch Coagulation und Abfiltriren desselben befreite Theil²⁾ von wirksamen Schilddrüsenextracten, der dann völlig jodfrei auch völlig unwirksam im Sinne der Schilddrüsentherapie ist. Vor Kurzem fand Oswald,³⁾ welcher aus der Thyreoidea 2 Eiweisskörper isolirte, von denen einer jodhaltig ist und bei der Spaltung mit Säuren Jodothyrin liefert, der andere aber jodfrei ist, dass nur der jodhaltigen Substanz eine Wirksamkeit auf den Stoffwechsel zukommt, während sich der andere Eiweisskörper in dieser Beziehung völlig indifferent verhält.

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1896. Nr. 47.

²⁾ Ausgangsmaterial für die Darstellung des Fränkel'schen Thyreoantitoxins und der Kocher-Drechsel'schen Körper.

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. XXVII, S. 14.

Seit einiger Zeit habe ich über diese Frage von einem andern Gesichtspunkte aus Versuche angestellt, indem ich die Einwirkung gleich grosser Mengen getrockneter, unveränderter Schilddrüse von verschiedenem Jodgehalt auf den Stoffwechsel desselben Thieres untersuchte. Die Feststellung des Stoffwechselausschlags dürfte wohl neben Beobachtung der Einwirkung auf parenchymatöse Strumen der zuverlässigste Weg sein, sich über eventuell verschiedene Wirksamkeit von Schilddrüsenprodukten ein Urtheil zu bilden. Es besteht wenigstens von Seiten der einzelnen Untersucher kaum eine Meinungsverschiedenheit über die sichere Beeinflussbarkeit von Stoffwechsel und Struma durch wirksame Schilddrüsenpräparate. Auch ist dabei eine gewisse Schätzung der Stärke der Wirkung möglich. Die Schwierigkeiten aber aus der Aenderung des wechselvollen und häufig spontane Besserungen zeigenden Krankheitsbildes der Tetanie thyreoidectomirter Hunde einen sicheren Schluss auf die therapeutische Leistungsfähigkeit eines Schilddrüsenpräparates zu ziehen, sind sehr gross und die Resultate der Forscher in Folge dessen auch zum Theil widersprechend.¹⁾ Neuerdings ist es Pugliese nicht einmal gelungen, durch Behandlung mit Gesamtdrüsensubstanz, deren Darreichung schon vor der Operation begonnen wurde, von 12 entdrüsten Hunden einen einzigen zu retten.²⁾ Auch Gley betont, wie schwer es oft ist, sogar mit intravenöser Injection von Schilddrüsenensaft den

1) Gottlieb, Münch. med. Wochenschr., 1896, Nr. 15; Hildebrandt, Berl. klin. Wochenschr., 1896, Nr. 37; Baumann und Goldmann, Münch. med. Wochenschr., 1896, Nr. 47; Irsai, Münch. med. Wochenschr., 1896, Nr. 51; Stabel, Berl. klin. Wochenschr., 1897, Nr. 33, 34, 35; Gley, *Revue Générale des Sciences*, 1898, Nr. 1, S. 16. v. Vamossy und Vas, Münch. med. Wochenschr., 1897, Nr. 25. Die Versuche von Wormser (*Pflüger's Archiv*, 1897, Bd. 67) kommen wenigstens für das Jodothyryn nicht in Betracht, da er zum Theil Methoden zur Darstellung desselben verwendete, durch welche dasselbe nicht oder nur in Spuren erhalten werden kann, wie z. B. durch Extraction des aus einem Schilddrüsenextract durch Hitze und Essigsäure coagulirten Eiweisses durch Alkohol. Vergl. loc. cit. S. 519 und Baumann, Münch. med. Wochenschr., 1896, Nr. 14.

2) *Pflüger's Archiv*, Bd. 72, S. 305.

Zustand der operirten Hunde günstig zu beeinflussen, und macht auf die Neigung des Krankheitszustandes zu spontaner Besserung aufmerksam.¹⁾ Vielleicht erweist sich die Katze als ein geeigneteres Object für solche Untersuchungen. Wenigstens konnte M. Lange²⁾ die tetanischen Erscheinungen derselben durch Jodothyriminjection jeweils beseitigen, oder Kaninchen, die ein mehr chronisches Krankheitsbild nach der Operation darbieten und bei denen Hofmeister mit der Substanz ebenfalls positive Resultate erzielte.³⁾ Für meine Untersuchungen, bei denen es sich aber zum Theil um die Vergleichen der Wirksamkeit verschieden stark wirksamer Präparate handelte, glaubte ich von Versuchen an entdrüsten Thieren von vornherein Abstand nehmen zu müssen.

Ich wählte deshalb den Stoffwechselversuch und beobachtete in zweiter Reihe die Einwirkung auf den parenchymatösen Kropf. Dabei konnte allerdings nicht erwartet werden, dass die Wirkung auf den Stoffwechsel etwa dem Jodgehalt der Präparate quantitativ entsprechend ausfallen würde, wie ja überhaupt die pharmakologische Wirkung einer Substanz nicht den Gewichtsmengen proportional zu wachsen pflegt. Ich glaubte aber schon etwas zur Frage beizutragen, wenn gezeigt werden konnte, dass eine gewisse Menge von Schilddrüsensubstanz mit geringem Jodgehalt schwächer wirkte, als dieselbe Menge mit erheblich stärkerem Jodgehalt, da ja kein Grund vorliegt, anzunehmen, dass sich die eventuell in der Drüse ausserdem noch vorhandenen anderen wirksamen Substanzen auch vermehren, wenn die jodhaltige Substanz zunimmt, oder dass eine sehr schwach oder gar nicht jodothyrinhaltige Drüse auch die andern hypothetischen Substanzen kaum oder nicht enthält.

Es lag mir bei diesen Untersuchungen auch daran, festzustellen, ob eine mit Jod möglichst gesättigte Schilddrüse

1) *Revue Générale des Sciences*, 1898, Nr. 16, S. 16.

2) *Die Beziehungen der Schilddrüse zur Schwangerschaft. Zeitschr. f. Geburtshülfe u. Gynäkologie*, Bd. 40, S. 2.

3) *Deutsche med. Wochenschr.*, 1896, Nr. 22.

unwirksam (ungiftig nach Blum) geworden ist, was eintreten müsste, wenn die Anschauung Blum's¹⁾ zutreffen würde, dass in der Schilddrüse eine Entgiftung von Toxinen durch Jod vor sich geht.

Für die Versuche stand mir ein Material von menschlichen Schilddrüsen zur Verfügung, das ich der Güte des Herrn Geh. Medicinalraths Heller in Kiel verdanke und wofür ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche. Es war dies eine grössere Anzahl von Kinderschilddrüsen aus verschiedenen Altern. Dieselben wurden in 4 Grössen sortirt und getrocknet. Das Trockengewicht betrug durchschnittlich 0,2, 0,3, 0,5 g pro Drüse bei den 3 kleinen Sorten, 3,5 g bei erheblich grösseren Drüsen, welche von Kindern nahe oder in der Pubertätszeit stammten. Die Untersuchung des Jodgehalts ergab bei den 3 kleineren Arten fast genau denselben Werth, nämlich 0,2—0,3 mg Jod für 1 g Trockensubstanz, während bei den grössten dieselbe Menge durchschnittlich 1,8 mg Jod enthielt. Mit diesem Material wurden die ersten vergleichenden Stoffwechseluntersuchungen ausgeführt. — Weiter wurden dazu Hundeschilddrüsen verwendet. Schon Baumann hatte bei einer Anzahl Hunde, welche 4 Wochen nur mit Fleisch ernährt worden waren, gefunden, dass dieselben in ihrer Schilddrüse Jod nur in Spuren oder in überhaupt nicht nachweisbaren Mengen enthielten.²⁾ Es wurde deshalb ein kräftiger, 5—6jähriger Hund von 12 kg 6 Wochen nur mit Fleisch und Wasser ernährt und dann mit Blausäure getötet. Die frisch 20,5 g, trocken 6 g wiegende Schilddrüse, welche makroskopisch sichtbare kleine Colloidkörnchen im Schnitt aufwies, enthielt aber noch 5,4 mg Jod. Dasselbe kann nicht wohl in dieser Menge mit dem Fleisch aufgenommen worden sein, sondern stammt wahrscheinlich von früher von einer andern Ernährung und wurde in Form des Colloids abgelagert. Dass das Jod sich im Colloid befindet, kann durch die neueren Untersuchungen

1) Vgl. Münch. med. Wochenschr., 1898, Nr. 8, 9, 11 u. Berl. klin. Wochenschr., 1898, Nr. 43. Congress f. Innere Medicin XVI. 1898 u. diese Zeitschr. XXVI. S. 160.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXII, S. 14.

besonders von Oswald¹⁾ als festgestellt angesehen werden. Ein ähnliches Bild bot die Drüse eines ziemlich alten Metzgerhundes, der in der letzten Zeit wenigstens vorwiegend Fleischnahrung erhalten hatte. Die Drüse des etwa 50 Pfund schweren, ebenfalls mit Blausäure getöteten Thieres wog frisch 7,6 g, trocken 1,8 g, enthielt ebenfalls kleine Colloidkörnchen und im Ganzen 1,8 mg Jod. Dagegen wurden die Schilddrüsen einiger anderen Hunde, deren Nahrung mit Sicherheit nicht genauer festgestellt werden konnte (siehe später Tabelle, S. 55 u. 56) jodfrei gefunden und zum Theil zu den Stoffwechselversuchen benutzt. Ausserdem versuchte ich zu diesem Zweck die Schilddrüse eines kräftigen, 16 kg schweren Hundes künstlich mit Jod zu sättigen. Derselbe erhielt 6 Mal jeden zweiten Tag 1 g Kal. jodat. subcutan oder in einer kleinen Menge Milch per os ohne Verlust und dann nach jeweils 2 Tagen 3, dann 4, dann 5 g Kal. jodat. Das Thier blieb gesund, magerte aber trotz reichlicher Nahrung ab und wurde 5 Stunden nach der letzten Jodkaliumgabe durch Blausäure getötet. Die frisch 25,6, trocken 7,5 g schwere, ganz normale Drüse enthielt 26,25 mg Jod.

Die Einwirkung dieser verschieden jodhaltigen Schilddrüsensubstanzen auf den Stoffwechsel wurde wie in früheren Versuchen²⁾ untersucht, indem ein Hund mit ausreichender, täglich der gleichen Nahrung, die er immer völlig nahm, so lange gehalten wurde, bis die N-Ausscheidung und das Gewicht einigermassen gleich blieben; dann erhielt er die auf ihre Wirksamkeit zu prüfende Substanz. Am Schlusse jeden Versuchstages (Morgens 10 Uhr), um welche Zeit der Rest des gesammelten Tagesharns und meist auch Stuhl entleert wurde, folgte die Wägung, dann die Darreichung des Futters und eventuell der Schilddrüsensubstanz in einem Theile der Milch der Tagesration aufgeschwemmt. Die eingegebene Menge Drüse betrug jeweils 5,0 g trocken.

1) loc. cit. u. diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 265.

2) Vgl. diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 20 u. XXII, S. 59.

Die angestellten Versuche waren folgende:

I. Versuch mit Kinderschilddrüsen:

Tabelle I.

Datum	Harnmenge	Spec. Gewicht	N-Gehalt	Gewicht des Hundes	Einnahmen
11. XII. 98.	700	1019	9,50	12130	250 g Hundekuchen, 400 Wasser, 500 Milch.
12.	700	1017	8,84	12130	
13.	750	1017	8,95	12100	
14.	690 durchschnittlich	1017	8,92	12000	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen, 1 g = 0,25 mg Jod = zusammen: 1,25 mg Jod.
15.				11980	
16.				11970	
17.	785	1015	9,06	11820	
18.	800	1015	8,70	12000	
19.	750	1016	8,95	11900	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen, 1 g = 1,8 mg Jod = zusammen: 9 mg Jod.
20.	755	1017	8,79	11890	
21.	705	1017	8,24	11900	
22.	810	1017	10,00	11720	
23.	735	1018	9,02	11620	
24.	530	1019	7,20	11630	
25.	665	1018	7,86	11610	
26.	580	1019	7,71	11510	
27.	640	1020	8,87	11500	

Da während des obigen Versuchs das Gewicht des Hundes langsam zurückging und nach dem durch die Schilddrüse bewirkten Verlust nicht wieder anstieg, wurde bei den folgenden Versuchen die Ration Hundekuchen auf 350 g erhöht.

II. Versuche mit Kinderschilddrüsen:

Tabelle II.

Datum	Harnmenge	Spec. Gewicht	N- Gehalt	Gewicht des Hundes	Einnahmen.
5. I. 99.	580	1023	9,13	12100	850 g Hundekuchen, 500 Milch, 400 Wasser.
6.	675	1022	9,82	12120	
7.					

Datum	Harnmenge	Spec. Gewicht	N- Gehalt	Gewicht des Hundes	Einnahmen
8.	640	1023	9,43	12010	
9.	660	1023	9,74	12130	
10.	720	1020	9,09	12020	
11.	660	1021	8,77	12050	
12.	640	1021	9,15	12100	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen. 1 g = 0,25 mg Jod = zusammen: 1,25 mg Jod.
13.	740	1021	10,25	12120	
14.	680	1020	8,52	12160	
15.	705	1021	9,69	12250	
16.				12300	
17.	650	1022	9,28	12450	
18.				12550	
19.				12650	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen. 1 g = 1,8 mg Jod = zusammen: 9 mg Jod.
20.	610	1022	9,39	12500	
21.	770	1020	10,42	12600	
22.	685	1021	10,11	12480	
23.	615	1025	9,60	12700	
24.	460	1024	7,51	12730	
25.	620	1022	9,09	12820	
26.	690	1020	9,22	12850	
27.	660	1020	9,01	12870	
29.	680	1023	9,47	12970	
30.	670	1021	8,60	13040	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen. 1 g = 0,25 mg Jod = zusammen: 1,25 mg Jod.
31.	730	1021	10,24	13030	
1. II. 99	620	1023	9,33	13110	
2.	625	1023	9,42	13020	
3.	660	1023	9,58	13040	
4.	625	1022	9,53	13070	Nahrung + 5 g Kinderschilddrüsen. 1 g = 1,8 mg Jod = zusammen: 9 mg Jod.
5.	770	1021	10,78	12930	
6.	780	1021	10,45	12900	
7.	545	1022	8,76	13030	
8.	730	1023	10,85	13050	
9.	540	1023	9,05	13070	
10.	590	1023	8,43	13270	

III. Versuche mit Hundeschilddrüsen:

Tabelle III.

Datum	Harnmenge	Spec. Gewicht	N- Gehalt	Gewicht des Hundes	Einnahmen.
17. II. 99.	590	1023	9,43	13780	350 g Hundekuchen, 500 Milch, 400 Wasser.
18.	660	1021	9,24	13800	
19.	710	1020	9,46	13910	
20.	730	1020	9,45	13930	Nahrung + 5 g Hundeschilddrüsen, jodfrei. ¹⁾
21.	650	1021	9,56	13900	
22.	660	1022	9,70	13980	
23.	550	1022	8,56	14140	Nahrung + 5 g Hundeschilddrüsen, jodfrei. ²⁾
24.	590	1024	9,60	14120	
25.	650	1021	9,05	14100	
26.	630	1023	9,15	14170	Nahrung + 5 g Hundeschilddrüsen, 0,2 = 0,7 mg Jod = zusammen; 17,5 mg Jod.
27.	640	1021	9,00	14080	
28.	—	—	—	14190	
1. III. 99.	—	—	—	14210	
2.	630	1023	9,30	14260	
3.	660	1022	9,20	14280	
4.				14320	
5.	570	1024	9,35	14390	
6.	660	1023	10,25	14300	
7.	650	1024	9,91	14220	
8.	570	1025	9,26	14300	
9.	580	1024	8,93	14360	
10.	550	1024	9,18	14550	
11.	—	—	—	14620	

Aus allen Versuchen mit menschlicher Schilddrüse geht die erheblich stärkere Einwirkung der jodreicheren Substanz auf den Stoffwechsel hervor sowohl in Bezug auf die N-Aus-

¹⁾ Die verabreichte Schilddrüsen substanz war ein Gemisch der beiden gesund getöteten Hunde Nr. 22 und 27 der später folgenden Tabelle.

²⁾ Die verabreichte Substanz stammt von der wegen einer Geschwulst getöteten, sonst noch recht munteren Ulmer Dogge. (Tabelle Nr. 31.) Die Schilddrüse erwies sich bei der späteren mikroskopischen Untersuchung als carcinomatös infiltriert. Der Versuch hat deshalb keine Bedeutung und wird nur angeführt, um die Reihe nicht zu stören.

scheidung wie die Gewichtsverminderung. Die jodschwache Schilddrüsensubstanz bewirkte jeweils zwar eine Zunahme in der Ausfuhr von N, welche in allen Fällen erheblicher ist, als das Plus an N-Einnahme in Form der trockenen Schilddrüsensubstanz.¹⁾ Eine nennenswerthe Gewichtsabnahme trat aber wenigstens in Versuch II bei der reichlicheren Nahrung nicht ein. Nach Eingabe der jodreicheren Drüsen war jeweils die N-Ausscheidung stärker und länger dauernd und eine deutliche Gewichtsabnahme des Thieres festzustellen.

Bei Verfütterung der Hundeschilddrüsen erfolgte ein nennenswerther Ausschlag in Bezug auf N-Ausscheidung und Körpergewicht durch die jodfreie Drüsensubstanz nicht. Dagegen wirkte die künstlich möglichst mit Jod gesättigte Schilddrüse in derselben Menge recht erheblich auf den Stoffwechsel, sowohl in Bezug auf N-Ausscheidung wie Gewichtsabnahme.

Diese Versuche scheinen mir in genügender Weise darzuthun, dass die Wirksamkeit der Schilddrüsensubstanz auf den Stoffwechsel allein durch die organische Jodverbindung, deren wirksamen Kern das Jodothyryn bildet, bedingt ist.

Von Einzelnen wurde die Art der Wirksamkeit der Schilddrüsensubstanz resp. des Jodothyryns als toxisch (giftig) bezeichnet. Es schien dies gerechtfertigt durch die von vielen Untersuchern festgestellte Vermehrung der N-Ausscheidung durch die Substanz,²⁾ welche vermehrte Ausscheidung als der Ausdruck einer Einschmelzung von Körpereiwiss angesehen wurde. Nach den Versuchen von Schöndorff,³⁾ die sich über längere Zeit erstreckten, hat aber die Schilddrüsenfütterung zunächst keinen Einfluss auf den Eiweissstoffwechsel. Die anfängliche Steigerung der N-Ausscheidung ist nach diesem Forscher durch eine vermehrte Auslaugung von Harnstoff und

¹⁾ 5 g trockener Schilddrüsensubstanz enthalten durchschnittlich etwa 0,5 g N.

²⁾ Vergl. die Untersuchungen von Dennig, Münch. med. Wochenschrift, 1895, Nr. 17 u. 20, Bleibtreu u. Wendelstadt, Deutsche med. Wochenschr., 1895, Nr. 22, am gesunden Menschen und die schönen Versuche von F. Voit am Hunde, Zeitschr. f. Biologie, 1897, S. 116.

³⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 63, S. 423 u. Bd. 67, S. 395.

N-haltigen Extractivstoffen aus den Geweben zu erklären, welche bei Fortsetzung der Medication bald aufhört, während die sonstige Steigerung der Oxydationsprocesse weitergeht. Erst wenn das Fett ein gewisses Minimum erreicht hat, wird auch das Eiweiss angegriffen. Die Schilddrüse steigert also die Oxydationsprocesse im Körper, welche eigenartige Stoffwechselwirkung als toxisch zu bezeichnen mir nicht entsprechend zu sein scheint.

Dieser Stoffwechselwirkung wegen nimmt Blum in der Schilddrüse toxische Substanzen an,¹⁾ und da er fand, dass wirksamer Schilddrüsenensaft durch künstliche Jodirung bei schwach alkalischer Reaction und einer Temperatur von 40 bis 50° unwirksam auf den Stoffwechsel wurde — ein Vorgang, den er dem in der Schilddrüse vor sich gehenden Jodirungsprocess als « analog » bezeichnet — nimmt er weiter an, dass diese supponirten toxischen Substanzen, welche Eiweisscharakter zeigen, sich in der Schilddrüse mit dem Jode umsetzen und dadurch entgiftet werden.²⁾ Schon vor einiger Zeit habe ich darauf hingewiesen, dass die künstliche Jodirung von Schilddrüsensubstanz ausserhalb des Körpers und die Bildung der Jodverbindung in der Drüse im Leben durchaus verschiedene Vorgänge sein müssen.³⁾ Die obigen Stoffwechselversuche geben dafür einen Beweis. Da die während des Lebens so weit als möglich durch Zufuhr von Jodkalium jodirte Schilddrüse unseres Hundes recht wirksam war (toxisch nach Blum), kann die von demselben angenommene Entgiftung von Toxinen durch Jod nicht wohl stattgefunden haben, da dieselben durch das so reichlich zugeführte Jod wohl völlig hätten entgiftet werden müssen. Der Einwand, dass die Thyreoidea unseres Hundes mit Jod nicht gesättigt war, erledigt sich wohl damit, dass dem Thiere in 18 Tagen 20 g Jodkalium zugeführt wurden und der Hund getötet wurde, als er direkt unter der

1) Siehe auch die Respirationsversuche von Magnus Levy, Berl. klin. Wochenschr., 1895, Nr. 30, Deutsche med. Wochenschr., 1896, Nr. 31; Nehring u. Thiele, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. XXX, 1896.

2) loc. cit.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 242.

Wirkung einer grossen Dosis Jodkalium sich befand (5 Stunden nach Einnahme von 5 g). Es stand deshalb jedenfalls der Schilddrüse so viel Jod zur Verfügung, als Neigung aufzunehmen vorhanden war.

Unsere Versuche, in denen sich die jodfreie Schilddrüse als unwirksam erwies, möglichst jodreich gemachte aber als wirksam, scheinen mir eher zu zeigen, dass die Wirksamkeit der Drüsen mit der Bildung der Jodsubstanz erst beginnt. Dass die Wirkung bei steigendem Jodgehalt wächst, ergaben die Versuche mit der menschlichen Drüsensubstanz. Als nothwendige Folge der Blum'schen Hypothese müsste aber gerade das Gegentheil eintreten, jodfreie Schilddrüse, in der eine Entgiftung durch Jod nicht wohl stattgefunden haben kann, müsste am wirksamsten (giftigsten) sein, und die Wirksamkeit mit wachsendem Jodgehalt eher abnehmen, um bei maximalem völlig zu verschwinden.

Versuche am Kropf.

Bei der Untersuchung der Wirksamkeit von Schilddrüsen verschiedenen Jodgehalts auf den parenchymatösen Kropf ergaben sich Resultate, die denen bei den Stoffwechselversuchen erhaltenen völlig entsprachen. Es wurde auch hier eine mit dem Jodgehalt wachsende Wirksamkeit gefunden, während Schilddrüsensubstanz, in der dieses Element nicht nachweisbar war,¹⁾ gar keine oder kaum angedeutete Wirkung ausübte. Sobald aber auch nur sehr geringe Mengen bestimmbarer Jodsubstanz sich in der verabreichten Drüse fanden, war die Wirkung sofort deutlich (Fall 4). Dass Schilddrüse, in der Jod chemisch sich nicht nachweisen liess, nicht absolut unwirksam war, erklärt sich ungezwungen daraus, dass die Schilddrüse ein feineres Reagens auf die Jodsubstanz ist, als die chemische Reaction, während der Stoffwechsel durch solche minimale Spuren anscheinend noch nicht merklich beeinflusst wird. So wurde von Miculicz gefunden, dass bei Eingabe grösserer Mengen von Thymus sich

1) Es wurden zuerst 0,5 g und, wenn sich kein J nachweisen liess, 1,0 g Trockensubstanz zur Bestimmung verwendet.

die Strumen verkleinerten.¹⁾ Diese Beobachtung war sehr auffallend, bis Baumann Spuren von Jod, aber erst bei Verarbeitung grösserer Mengen von Kalbsthymus, in diesem Organe nachwies.

Die Untersuchungen am Kropf wurden mit getrockneten Schweineschilddrüsen angestellt (vergl. Tabelle S. 56) und folgende Fälle genauer beobachtet:

1. W. Theresia, 14 Jahre, bemerkt seit etwa 6 Wochen einen dicken Hals, der sie weiter nicht belästigt.

Rechter und Mittellappen in mässigem Grade vergrössert, zusammen etwa wallnussgross, ziemlich gleichmässig und weich fühlbar. Linker Lappen weniger stark hypertrophisch, aber gut abzutasten. Umfang 31,5 cm.

15. V.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsen-

16. V.: „ „ „ 0,5 „ „ „ [substanz.

17. V.: Struma vielleicht etwas weicher, aber nicht kleiner geworden. Die Vortreibungen der Lappen etwa dieselben. Umfang 31,5 cm.

18. V.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

19. V.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

20. V.: Schilddrüse heute ganz deutlich verkleinert. Lappen beiderseits viel kleiner und weicher zu fühlen. Patientin bemerkt dies auch selbst im Gegensatz zum ersten Male. Umfang 31 cm.

Da der Versuch damit beendet war, wurde, um Material zu sparen, mit Jodothyryn (täglich 1 g) weiter behandelt und weitere Verkleinerung erreicht.

2. A. Ursula, 21 Jahre. Seit längerer Zeit dicker Hals, unter dem Patientin nicht viel leidet.

Rechter und linker Lappen erheblich vergrössert und vorgetrieben. Rechter Lappen halbeigross, ziemlich weich, in demselben eine derbe, haselnussgrosse, etwas bewegliche Cyste. Linker Lappen kleinapfelgross. Weiche Cyste? mit parenchymatöser Umgebung. Umfang im oberen Theile 35,0 cm, Umfang im unteren Theile 37,5 cm.

31. V.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz.

1. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz.

2. VI.: Drüse vielleicht etwas kleiner und weicher geworden. Patientin will aber keine Besserung gelten lassen. Umfang oben 35,0 cm., unten 37,0 cm.

1) Berl. klin. Wochenschr., 1896, Nr. 16.

3. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

4. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

5. VI.: Beiderseits deutliche Abnahme der Lappen, was auch Patientin zugibt. Besonders hat sich der rechte Lappen verkleinert, und die früher eingehüllte, haselnussgrosse Cyste ist zu einem grossen Theile frei abtastbar. Der linke Lappen ebenfalls kleiner und die jetzt fast den ganzen Lappen einnehmende Cyste sehr deutlich. Umfang oben 34,5 cm., unten 36,5 cm.

Weiterbehandlung mit Jodothyryn, täglich 1,0 g, und später Unguent. Kal. jodat.

8. K. August, 17 1/4 Jahre, bemerkt seit einigen Monaten eine Schwellung am Hals, die in der letzten Zeit langsam zugenommen hat. Bei Treppensteigen und Laufen manchmal Engigkeit.

Rechter, Mittel- und linker Lappen ziemlich erheblich diffus vergrössert. Die Schwellung ist mässig derb, im Mittellappen eine undeutlich abgrenzbare, etwa haselnussgrosse Cyste. Die Vortreibungen sind beiderseits etwa so gross, wie ein in der Längsachse halbirtes Gänseei, nicht scharf begrenzt. Umfang 36,5 cm.

5. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz.

6. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz. Abends: Keine deutliche Aenderung der Struma.

7. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz.

8. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene jodfreie Schilddrüsensubstanz.

9. VI.: Struma vielleicht etwas weicher und flacher, aber jedenfalls in sehr geringem Grade. Der intelligente Patient selbst ist sehr im Zweifel, ob eine Einwirkung zu bemerken ist. Umfang 36,5—36,0 cm.

9. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

10. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,15 mg Jod.

11. VI.: Ein Mal täglich 0,5 g. Mittags Untersuchung: Patient kommt mit dem Bemerken, dass sich jetzt der Hals zum ersten Male verkleinert habe. Die Vortreibungen sind auch erheblich flacher, die Lappen kleiner und weicher zu fühlen. Im Mittellappen grenzt sich die Cyste besser ab. Umfang 34,5 cm.

11. VI.: Abends ein Mal 0,5 g à 0,15 mg Jod.

12. VI.: 2 Mal täglich 0,5 g à 0,15 mg Jod.

13. VI.: Noch weiterer Rückgang deutlich. Seitenlappen nur noch im unteren Theile zu fühlen und sehr flach. Im Mittellappen an Stelle

der einen Cyste zwei kirschkerngrosse kleinere abzugrenzen. Umfang schwach 34,5 cm.

Weitere Behandlung mit Unguent. Kal. jodat.

4. H. Fritz, 9 $\frac{1}{2}$ Jahre, bemerkt seit einigen Monaten einen dicken Hals, der langsam zunimmt.

Rechter Lappen daumendick (Cyste?), linker Lappen diffus parenchymatös vergrössert, etwa halb so gross wie rechter. Auch Mittellappen vorgetrieben und ziemlich derb. Umfang 29,5 cm.

5. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,04 mg Jod.

6. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g trockene Schilddrüsensubstanz à 0,04 mg Jod.

7. VI.: Mittags: Struma deutlich kleiner geworden, was auch der Junge selbst bemerkt. Die Drüse ist etwa um ein Drittel zurückgegangen, aber noch deutlich in ihrem ganzen Umfang abzutasten. Rechter Lappen etwa noch fingerdick, der linke etwas dünner, Mittellappen noch erheblich vorgetrieben. Umfang schwach 29 cm.

7. VI.: Abends: 0,5 g Schilddrüsensubstanz à 0,4 mg Jod.

8. VI.: Zwei Mal täglich 0,5 g Schilddrüsensubstanz à 0,4 mg Jod.

9. VI.: Sehr erhebliche Verkleinerung der ganzen Drüse gegenüber dem letzten Mal. Vortreibung links kaum mehr zu sehen und der Lappen kaum zu fühlen. Vortreibung auch rechts geringer. Dasselbst an Stelle des Lappens eine längliche, kleinfingerdicke, derbe Cyste. Umfang schwach 28 cm.

Weiterbehandlung mit Unguent. Kal. jodat.

Aus diesen Untersuchungen und den bei Beobachtung des Stoffwechsels gemachten Erfahrungen geht unzweifelhaft hervor, dass die Wirksamkeit der Schilddrüse durch den Gehalt an organischer Jodsubstanz (Jodothylin) bedingt ist, dass die Wirksamkeit grösser ist, wenn die Drüse mehr Jodsubstanz enthält und so gut wie ganz fehlt, wenn diese nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Es würde nun noch übrig bleiben, diese Untersuchungen auch auf das Myxoedem auszudehnen, was mir hier aus Mangel an solchen Krankheitsfällen leider unmöglich ist.

II. Ueber den Jodgehalt der Schilddrüsen von Thieren.

Schon von Baumann wurde neben einer grossen Reihe menschlicher Schilddrüsen auch eine Anzahl Thierschilddrüsen

auf ihren Jodgehalt untersucht. Es fand sich ein solcher beim Hammel, Rind, Pferd regelmässig und meist von erheblicher Grösse, bei den untersuchten Schweinen war derselbe viel geringer oder kaum nachweisbar. Hunde zeigten ein schwankendes Verhalten je nach der Ernährung. Nach Fleischnahrung waren nur Spuren von Jod oder überhaupt kein solches vorhanden; bei Verabreichung von Hundekuchen, welcher einen Zusatz von Zuckerrüben enthält, fanden sich jeweils deutliche Mengen, erheblichere nach Fütterung mit Stockfisch und Thymus, welche nachweisbar jodhaltig sind.¹⁾ Daraus ging schon der grosse Einfluss der Nahrung auf den Jodgehalt der Schilddrüsen hervor. Es schien mir nun wünschenswerth, diese Untersuchungen auf möglichst viele Thiere von verschiedener Ernährungsart auszudehnen. Die Jodbestimmungen wurden, wie früher beschrieben,²⁾ auf colorimetrischem Wege unter Verwendung von Nickeltigel mit möglichst geringem Glühen und möglichst wenig Salpeter ausgeführt. Das verwendete Chloroform betrug bei jodarmen Drüsen 5 ccm. Wenn die Substanz ausreichte, wurden immer Kontrollbestimmungen ausgeführt.

Die in Tabelle IV (Seite 55-56) aufgeführten Thiere konnten in die Untersuchungen einbezogen werden.

Auch hier zeigen die Thiere derselben Ernährungsart ein ähnliches Verhalten in Bezug auf den Jodgehalt ihrer Schilddrüsen. Bei den fast reinen Fleischfressern (Fuchs, Marder, Iltis, Wildkatze) lässt sich mit wenigen Ausnahmen mit unserer Methode Jod überhaupt nicht nachweisen, während die Grasfresser (Rehe) regelmässig einen besonders auch in Anbetracht ihrer relativ kleinen Drüsen³⁾ nicht unbeträchtlichen Jodvorrath ebenso wie Schafe, Rinder und Pferde zeigen. Bei den Hasen ergab die Untersuchung zum Theil auffallend kleine Werthe, ziemlich hohe dagegen der Dachs. Bei den Omnivoren Hund

1) Baumann, Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 492 und Bd. XXII, S. 14 u. 17.

2) Baumann und Roos, Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 489. Oswald, Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 275.

3) Vergl. die Schilddrüsengewichte mit denen der viel kleineren Raubthiere in der Tabelle.

Tabelle IV. Thierschilddrüsen.

	Gewicht der Drüsen in Gramm		Jodgehalt der Drüsen in Milligramm
	frisch	trocken	
1. Fuchs, grosses Thier	1,7	0,4	Kein Jod.
2. Fuchs, mittelgross	2,0	0,5	Kein Jod
3. Fuchs, klein	0,85	0,25	Kein Jod
4. Steinmarder, starkes Thier	0,8	0,2	Kein Jod
5. Steinmarder, ziemlich starkes Thier	0,7	0,2	Kein Jod
6. Steinmarder, mittelgross	0,9	0,2	0,4
7. Steinmarder	0,6	0,15	Kein Jod
8. Baummarder, mittelgross	0,2	0,05	Spur Jod = etwa 0,05
9. Baummarder, mittelgross	—	0,05	Kein Jod
10. Iltis	0,2	0,05	Kein Jod
11. Echte Wildkatze, starkes Thier . .	1,0	0,25	Kein Jod
12. Hauskatze, mittelgross	0,2	0,05	Kein Jod
13. Hauskatze, starkes Thier	1,7	0,4	Kein Jod
14. Hauskatze, klein	0,3	0,1	0,07
15. Hauskatze	0,4	0,1	Spur Jod
16. Hauskatze	0,8	0,2	Spur Jod
17. Hauskatze	0,6	0,15	Kein Jod
18. Hauskatze	0,9	0,2	0,1
19. Hauskatze, hochträchtig	1,7	0,35	Kein Jod
20. Kater, starkes Thier	1,8	0,35	Spur Jod
21. Hund, 6 Wochen vor Tödtung nur Fleischnahrung und Wasser . . .	20,5	6,0	5,4
22. Hund, etwa 2jähr., 40 Pfund schwer, gesund getödtet, Nahrung sehr wahrscheinlich gemischt	15,5	2,6	Kein Jod
23. Hund, alt, etwa 50 Pfund schwer, gesund getödtet, Metzgerhund . .	7,6	1,8	1,8
24. Hund, grosser Bernhardiner, kurz fieberhaft krank, deshalb getödtet	10,0	2,7	1,35
25. Hund, Spitz, etwa 10 Pfund schwer, kurz fieberhaft krank, getödtet . .	1,5	0,5	0,6
26. Hund, Schäferhund, etwa 30 Pfund schwer, gesund getödtet	18,0	5,0	4,16

	Gewicht der Drüsen in Gramm		Jodgehalt der Drüsen in Milligramm
	frisch	trocken	
27. Hund, etwa 15 Pfund schwer, gesund getödtet	15,5	2,7	Kein Jod
28. Hund, Dachshund, ziemlich alt, Augenentzündung, getödtet	6,0	1,2	Kein Jod
29. Hund, 32 Pfund schwer, mit Jodkalium behandelt (s. vorigen Abschnitt)	25,6	7,5	26,25
30. Hund, Fox, jung, 10 Pfund schwer, fiebrhaft krank, getödtet	0,85	0,2	0,05
31. Hund, sehr grosse Ulmer Dogge, wegen Carcinom getödtet	66,0	10,6	Kein Jod
32. Dachs, etwa 25 Pfund schwer . .	1,1	0,3	1,1
33. Dachs, etwa 20 Pfund schwer . .	0,6	0,15	0,2
34. Dachs, etwa 15 Pfund schwer . .	0,6	0,15	0,35
35. Reh, jung	0,9	0,2	0,35
36. Reh	1,7	0,5	0,6
37. Reh, Schilddrüse sehr stark fettig durchwachsen, blass	0,9	0,4	schwach 0,1
38. Rehbock, 37 Pfund schwer	1,3	0,4	0,9
39. Reh, etwa 30 Pfund schwer	1,6	0,45	0,8
40. Rehbock, 34 Pfund schwer	2,0	0,5	1,3
41. Reh, 30 Pfund schwer	0,9	0,25	0,6
42. Feldhase	0,2	0,07	Kein Jod nachweisbar
43. Feldhase, Drüsen zweier Thiere zus.	0,25	0,1	Kein Jod nachweisbar
44. Feldhase, Drüsen v. 4 Thieren zus.	0,9	0,3	0,05
45. Feldhase, Drüsen v. 7 Thieren zus.	2,0	0,6	0,35
46. Schwein	37,0	7,4	0,59
47. Schwein	30,5	7,5	2,25
48. Schwein	29,0	6,0	Kein Jod
49. Schwein	27,5	5,7	Kein Jod
50. Schwein	22,0	4,7	Kein Jod
51. Schwein	8,5	2,3	1,84
52. Schwein ¹⁾	23,0	4,9	1,47

¹⁾ Mit diesen so sehr wechselnden Jodbefunden beim Schwein steht auch die Beobachtung Dr. Aufrechts (Pharm. Ztg. 42. Jahrg. Nr. 67) im Einklang, der eine Reihe Thyreoidin-Tabletten des Handels, von verschiedener Provenienz — bisweilen werden zur Darstellung derselben auch Schweinsschilddrüsen benutzt — analysirte und neben anderen Ungleichheiten der Zusammensetzung auch einen sehr verschiedenen Jodgehalt fand, ja denselben in 2 Fällen ganz vermisste.

und Schwein wechselt der Befund sehr. Während sich dieses Element bei manchen überhaupt nicht nachweisen lässt, findet sich bei andern ziemlich viel davon. Dagegen besitzen die viel weniger omnivoren Hauskatzen durchweg einen äusserst geringen Jodvorrath. Die Art der Ernährung liess sich bei den untersuchten Thieren dieser Art nicht genauer feststellen. Dass der oben schon erwähnte Hund,¹⁾ welcher 6 Wochen nur mit Fleisch ernährt wurde, 5,4 mg Jod in seiner Schilddrüse hatte, ist nicht weiter auffallend. Dasselbe stammte offenbar aus einer früheren Zeit mit anderer Ernährung — die Drüse enthielt reichlich feinkörniges, hartes Colloid — und wurde während der Zeit der Fleischnahrung wenig oder nicht angegriffen. Für diese Anschauung spricht ein weiterer Versuch. Der zu den obigen Stoffwechseluntersuchungen benutzte Hund, der in der Zeit von Anfang December bis Mitte März öfters jodhaltige Schilddrüsensubstanz einbekam, wurde nach Abschluss der Versuche 10 Wochen lang ausschliesslich mit Fleisch und Wasser ernährt und dann getödtet. Die frisch 12,5, trocken 3,8 g schwere Schilddrüse enthielt 11,4 mg Jod.

Jedenfalls geht aus diesen Untersuchungen (s. Tabelle und die oben erwähnten Befunde Baumann's) ein durchgreifender Unterschied im Jodvorrath der Schilddrüsen von Fleisch- und Grasfressern hervor. Die Menge des Jods in der Drüse ist in erster Reihe von der Zufuhr dieses Elements abhängig, wie auch aus den grossen Ansammlungen bei künstlicher Eingabe ersichtlich ist. Sieht man von den im Inlande als Nahrung kaum in Betracht kommenden Seethieren ab, so wird die Hauptmenge des Jods mit den Pflanzen eingenommen, in deren Asche das Element schon vielfach nachgewiesen wurde. Ob nennenswerthe Spuren mit dem Trinkwasser in den Körper gelangen, ist zweifelhaft.²⁾ Die Fleischfresser nehmen in ihrer Nahrung, wenn sich nicht gerade eine jodhaltige Schilddrüse darunter befindet, gewiss viel weniger auf, als die Grasfresser. Ob bei den ersteren aber die aufgenommene Menge so klein ist, dass

¹⁾ S. 43.

²⁾ Vergl. Graham Otto. V. Aufl. 1878. I. S. 422 u. fflg. und Baumann. Münch. Med. Wochenschrift 1896, Nr. 14.

sich ein nachweisbares Depot nicht bilden kann, oder ob bei den Fleischfressern etwa ein relativ stärkerer Verbrauch von Jodsubstanz stattfindet, darüber fehlen einstweilen alle Anhaltspunkte.

Bisher wurde ein diesbezüglicher Versuch angestellt, bei dem allerdings nicht viel Aussicht auf ein positives Resultat vorhanden war, der aber meiner Ansicht nach immerhin ausgeführt werden musste. Es wurde nämlich versucht, ob sich im Harn eines Hundes bei Fleischnahrung vielleicht ebensoviel oder mehr Jod als bei vorwiegend vegetabilischer Kost nachweisen liesse. Die Aussicht, ein positives Resultat zu erhalten, war schon deshalb nicht gross, weil bei den Bestimmungen grössere Mengen organischen Harnrückstandes geschmolzen werden mussten und bei der dabei unvermeidlichen Hitzeentwicklung die jedenfalls sehr geringen Quantitäten Jod leicht flüchtig werden konnten. Zum Zwecke des Versuchs wurden jeweils 5 Liter Harn, der das eine Mal bei reiner Fleischnahrung gesammelt wurde, das andere Mal von einer Ernährungsperiode mit Hundekuchen, welche reichlich vegetabilische Zusätze haben, stammte, unter Zusatz von Natr. hydr. e natrio eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. In dem in Alkohol unlöslichen Theil fand sich beiderseits kein Jod. Dann wurden die Alkoholextracte eingedampft und die Rückstände in wenig warmem Wasser gelöst, so dass nach einigem Stehen Harnstoff auskrystallisirte. So wurde die Menge der zu schmelzenden organischen Substanz möglichst verringert. Die Mutterlauge wurde nun in erster Reihe auf Jodsatz mit Schwefelsäure und Natriumnitrit mit negativem oder jedenfalls sehr zweifelhaftem Erfolge untersucht, da andere färbende Substanzen ebenfalls in das Chloroform übergingen. Dann wurde ein grösserer Theil der Mutterlauge eingedampft und durch Schmelzen im Nickeltigel mit Natronhydrat und Salpeter colorimetrisch auf organisches Jod untersucht. Es wurde nur bei dem von der Hundekuchenfütterung stammenden Harn eine zweifelhafte Spur von Jod gefunden. Da an die Möglichkeit gedacht wurde, dass die beim Ansäuern des wässerigen Auszugs der Schmelze in ziemlicher Menge sich bildende salpetrige Säure die Farbenreaction stören könnte, wurde in anderen Portionen die Lösung der Schmelze mit Silbernitrat versetzt, nach Ansäuern abfiltrirt, die Silbersalze mit Natr. hydr. e natrio kurz geglüht und in dem wässerigen Auszug der Schmelze das Jod colorimetrisch nachzuweisen gesucht, was auch hier mit Sicherheit nicht gelang. Doch ist es immerhin möglich, dass beim Schmelzen der ziemlich grossen organischen Massen die geringen Mengen von Jod verloren gingen.

Ein principieller Unterschied zwischen Raubthier- und Grasfresserschilddrüse besteht aber offenbar nicht, da die Drüsen

der ersteren das Jod, wenn es dargeboten wird, ebenfalls auf-sammeln und den typisch wirksamen organischen Jodcomplex bilden. ¹⁾ Für eine durchaus genügende Erklärung der Entstehung dieser eigenartigen Jodverbindung in der Schilddrüse und ihrer Bedeutung für die Lebewesen liegt noch nicht genügend that-sächliches Material vor. Die Aufsammlung des Jods in dem Organ als einen mehr zufälligen Process zu betrachten, der für den Körper von keiner grösseren Bedeutung ist, wie anscheinend die Aufspeicherung mancher Metalle in der Leber, scheint mir aus dem Grunde keine befriedigende Auffassung, weil es dann ganz unverständlich wäre, warum die Schilddrüse aus dem aufgenommenen Jod den auf den Stoffwechsel und das Myxoedem so sehr wirksamen Jodothyrimcomplex bildet, während es doch sonst natürlicher erschiene, dasselbe etwa in Form einer viel neutraleren Jodeiweissverbindung abzulagern, wie sie ausserhalb des Körpers durch Einwirkung von Jod auf Eiweiss entstehen. Die plausibelste Erklärung scheint mir immer noch die zu sein, anzunehmen, dass die in der Schilddrüse gebildete Jodsubstanz vom Körper unter gewissen, bisher nicht näher bekannten Umständen für den richtigen Ablauf mancher Stoffwechselvorgänge gebraucht wird.

¹⁾ S. Stoffwechselversuch mit Schilddrüsensubstanz vom Hunde.

Die Xanthinkörper der Nebennieren.

Von

Johann Okerblom.

Aus dem Laboratorium von Prof. Nencki in Petersburg.

(Der Redaction zugegangen am 25. Juni 1899.)

Durch die Entdeckung von N. Cybulski und G. Olivier, dass der brenzcatenähnliche Körper der Nebennieren blutdruck-erhöhende Eigenschaften hat, ist das Interesse der physiologischen Chemiker für dieses Organ ein sehr reges geworden. Prof. Nencki, der mit der Darstellung dieser wirksamen Substanz beschäftigt war, machte die Beobachtung, dass beim Verdunsten wässriger Extracte der Nebennieren im Vacuum sich ein fein krystallinischer Niederschlag abscheidet, dessen Untersuchung ergab, dass er wesentlich aus Xanthin und den ihm verwandten Körpern besteht. Auf Wunsch von Prof. Nencki habe ich die genauere Untersuchung der Xanthinkörper der Nebennieren unternommen, und die bis jetzt erhaltenen Resultate bilden den Gegenstand der vorliegenden kurzen Mittheilung.

Gut von Fett und Bindegewebe befreite Nebennieren vom Rind wurden in einer Wurstmaschine klein zerkhackt, in Portionen von 300—500 g mit dem fünffachen Gewicht Wasser übergossen, zur Verhütung der Fäulniss auf je 1 Liter Wasser mit 5 ccm. Chloroform versetzt und 2 Tage lang bei Bruttemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde die Flüssigkeit, um die Eiweissstoffe zu coaguliren, auf dem Wasserbade erwärmt und mit verdünnter Essigsäure bis zu schwach saurer Reaction angesäuert. Das klare Filtrat wurde im Vacuum bei 35—40° auf ein kleines Volumen verdunstet, worauf sich an den Wänden

und am Boden des Gefässes ein weisslich-graues Pulver abgeschieden hat. Dieses Pulver, abfiltrirt und mit Wasser nachgewaschen, bestand, unter dem Mikroskope betrachtet, aus undeutlich krystallinischen Körnchen, die im polarisirten Lichte betrachtet doppelbrechend waren. Qualitative Proben ergaben darin keinen Phosphor oder Schwefel, wohl aber einen hohen Stickstoffgehalt. Eine Probe der Substanz, auf Porzellandeckel mit Salpetersäure verdunstet, hinterliess einen gelben Fleck, der durch Natronlauge schön roth wurde. Da dadurch die Anwesenheit von Xanthin oder Körpern der Xanthingruppe anzunehmen war, so wurde die Untersuchung des Pulvers nach der kürzlich von M. Krüger und G. Salomon¹⁾ für die Xanthinkörper ausgearbeiteten Methode ausgeführt.

8 g der Substanz — so viel betrug die Ausbeute aus 7,8 Kilo frischer Nebennieren — wurden in verdünnter Salzsäure aufgelöst. Da kein Rückstand hinterblieb, so war in dem Rohprodukt keine nennenswerthe Menge von Harnsäure vorhanden. Die Lösung wurde eingedampft und der syrupöse Rückstand zur Entfernung noch vorhandener Salzsäure mit 96 %igem Alkohol vermischt und von Neuem verdunstet, wobei die Masse grobpulverig wurde. Dieselbe wurde mit Wasser bei 40° digerirt, nach mehrstündigem Stehen abfiltrirt, mit Wasser salzsäurefrei, dann mit Alkohol und Aether gewaschen. Der Rückstand bei 120° getrocknet wog 5,5 g. Hierbei konnten in dem ungelösten Theile Xanthin, Heteroxanthin und I-Methylxanthin; in der wässerigen Lösung: Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin, sowie eine geringe Menge von Heteroxanthin und I-Methylxanthin enthalten sein.

Xanthinfraction — 5,5 g. Das Gemenge wurde in 3,3 %iger chlorfreier Natronlauge gelöst und 24 Stunden lang stehen gelassen, da aber keine Ausscheidung erfolgte, so konnte Heteroxanthin nicht darin enthalten sein. Die Lösung wurde auf 60° erwärmt und in ein kaltes Gemisch von 2,5 ccm concentrirter Salpetersäure und 25 ccm. Wasser langsam und

¹⁾ Zeitschrift für physiol. Chem. 26. 354.

unter Umrühren eingetragen. Beim Stehen in der Kälte schied sich salpetersaures Xanthin aus. Zur Darstellung des freien Xanthins wurde die ammoniakalische Lösung des Nitrates mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether gewaschen. Ich erhielt 3,56 g der bei 120° getrockneten Substanz, deren Analyse folgende Zahlen ergab: 0,2122 g gaben 0,3071 g CO₂ und 0,0505 g H₂O. —

0,1160 g der Substanz gaben 36,6 ccm. N-Gas bei 750 mm. Bar. und 13,4° C. —

Berechnet für C ₈ H ₈ N ₄ O ₈	Gefunden
C 39,47 %	C 39,46 %
H 2,63 „	H 2,69 „
N 36,84 „	N 36,86 „

Das I-Methylxanthin wurde aus dem salpetersauren Filtrate von Xanthinnitrat durch Uebersättigen mit Ammoniak und Eindampfen der Lösung als atlasglänzende Masse erhalten. Dieselbe wurde in Natronlauge gelöst und die Lösung mit verdünnter, warmer Salzsäure schwach angesäuert. Das I-Methylxanthin fiel als schweres Krystallpulver nieder. Die Menge desselben betrug nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Aether und nach dem Trocknen bei 120° 0,5 g. Die Analyse ergab: 0,1875 g der Substanz gaben 0,2955 g CO₂ und 0,0656 g H₂O.

Berechnet für C ₈ H ₈ N ₄ O ₈	Gefunden
C 43,37 %	C 42,98 %
H 3,61 „	H 3,89 „

Hypoxanthinfraction. Die vom Xanthin und I-Methylxanthin abfiltrirte salzsaure Lösung wurde heiss mit Ammoniak übersättigt und von ausgeschiedenem Eisenhydroxyd abfiltrirt. Beim Erkalten schieden sich in sehr geringer Menge kleine glänzende Prismen aus, die beim Eindampfen mit concentrirter Salpetersäure einen gelben Fleck hinterliessen, der mit Natronlauge orangeroth und bei weiterem Erwärmen violett wurde. Diese Reaction, sowie das Aussehen der Krystalle unter dem Mikroskop sprechen dafür, dass es Epiguanin war.

Das Filtrat wurde durch Kochen vom Ammoniak befreit und die nicht zu concentrirte Lösung in der Kälte mit Pikrin-

säurelösung in geringem Ueberschusse versetzt. Das in geringer Menge ausgeschiedene Pikrat wurde abfiltrirt, mit kaltem Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Die Menge des trockenen Salzes betrug 0,08 g. Im Capillarrohr erhitzt schmolzen die Krystalle bei $272-273^{\circ}$ unter Zersetzung. Allem Anscheine nach lag also Adeninpikrat vor.

Das mit Schwefelsäure angesäuerte Filtrat wurde durch Ausschütteln mit Benzol von überschüssiger Pikrinsäure befreit und die Gesamtmenge der noch vorhandenen Basen durch ammoniakalische Silberlösung gefällt. Der Niederschlag wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt und die wässrige Lösung der Basen eingedampft. Der Rückstand, der 1,5 g wog, wurde in 50 ccm. heisser, verdünnter Salpetersäure gelöst. Beim Erkalten schieden sich wetzsteinförmige Krystalle aus, die mit verdünnter Salpetersäure, dann mit Alkohol und Aether gewaschen wurden. Bei 120° getrocknet wogen die Krystalle 0,2 g und schienen aus reinem Hypoxantinnitrat zu bestehen. Leider ist mir ein Theil der Substanz bei der Analyse verloren gegangen, so dass ich nur mit einem geringen Rest eine Stickstoffbestimmung ausführen konnte. 0,0625 g des Nitrates gaben 19 ccm. N-Gas bei 17° C. und 754 mm Bar., entsprechend 35,17 % N. Die Formel: $C_5H_4N_4O \cdot NO_3H$ verlangt 35,23 % N.

Nach der Methode von M. Krüger und G. Salomon konnte ich daher aus 8 g der Xanthinbasen: Xanthin, 1-Methylxanthin und Hypoxanthin in reinem Zustande isoliren und mit grosser Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von Epiguanin und Adenin nachweisen. Da die Mutterlauge des Xanthinnitrates beim Uebersättigen mit Ammoniak keinen Rückstand hinterliess, so war darin auch kein Guanin vorhanden.

Ueber die uns hier interessirenden Substanzen der Nebeniene habe ich nur die einzige in Streckers Laboratorium ausgeführte Untersuchung aus dem Jahre 1867 von Dr. F. Holm¹⁾ aus Petersburg finden können. Um etwa vorhandene Harnsäure und Xanthin vollständig dem Gewebe zu entziehen, hat

¹⁾ Journ. für prakt. Chemie. Jahrgang 1867, S. 150.

Holm nach der Behandlung mit Weingeist noch eine Digestion mit Wasser bei 50° vorgenommen und die erhaltene Flüssigkeit nach einander mit neutralem und basischem Bleiacetat, dann mit Kupferacetat behandelt. — «Der basische Bleiniederschlag enthielt keine Harnsäure und lieferte eine reichliche Menge Inosit. Der Kupferniederschlag war frei von Xanthin und enthielt viel Hypoxanthin leicht löslich in verdünnter Salzsäure, beim Verdunsten ein in Nadeln krystallisirendes Salz gebend, das mit Kohle entfärbt und mit Ammoniak zur Trockne verdampft nach dem Ausziehen mit Wasser schwach gelb gefärbtes Hypoxanthin hinterliess. Dieses in verdünnter Salpetersäure gelöst und vorsichtig verdunstet hinterliess einen kaum gelblichen Fleck, der bei stärkerem Erhitzen rein citronengelb und beim Befeuchten und Erwärmen mit Natronlauge prächtig purpurfarben wurde.»

Wie aus meiner Untersuchung hervorgeht, besteht, im Gegensatz zu der Angabe Dr. Holms, die Hauptmenge der Xanthinkörper der Nebenniere aus Xanthin. Dann folgen das I-Methylxanthin, das Hypoxanthin, das Epiguanin und das Adenin. Es ist wohl möglich, dass bei Verarbeitung grösserer Quanta dieser Drüse noch mehr hierher gehörige Substanzen aufgefunden werden. Bemerken muss ich, dass, als ich 1,8 Kilo frischer Nebennieren sofort auf gleiche Weise verarbeitete, ich nur 0,5 g der Xanthinbasen, also 3,7 mal weniger, als nach zweitägiger Digestion bei der Bruttemperatur erhalten habe.

Zur Frage »Ueber das krystallinische Fibrin«.

Von
S. Dzierzowski.

(Aus dem Laboratorium für Darstellung der Heilsera am Institute für experimentelle
Medicin in Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 25. Juni 1899.)

Jedem, der sich mit der Darstellung der Heilsera beschäftigt, ist es bekannt, dass steriles, namentlich phenolisirtes Serum von Pferden oder Rindern nach mehrwöchentlichem Stehen einen geringen Niederschlag absetzt, der mit der Zeit sich noch vergrößert. Diesen Niederschlag habe ich vor drei Jahren untersucht¹⁾ und constatirt, dass er aus Eiweissstoffen, vermuthlich Fibrin, Fetten und Cholesterin, besteht. In Nr. 5, Bd. XXI—XXII, p. 239 des «Bulletin de la société chimique de Paris» hat Herr L. Maillard eine Arbeit über das krystallinische Fibrin (sur une fibrine cristallisée) veröffentlicht, worin er mittheilt, dass der Niederschlag, der beim längeren Stehen des Diphtherieheilserums entsteht, theilweise aus krystallinischem Eiweiss resp. krystallinischem Fibrin besteht. Dabei bemerkt er, dass ich bei meiner Untersuchung dieser Niederschläge das krystallinische Fibrin übersehen habe. Der Mangel genauer Daten in der Arbeit des Herrn Maillard über die Zusammensetzung und die näheren Eigenschaften dieses krystallinischen Fibrins war für mich Veranlassung, meinen vermeintlichen Fehler zu verbessern und den Niederschlag genauer zu untersuchen. Ich habe den Niederschlag von circa 100 Liter

¹⁾ Wratsch, 1896, N. 51, russisch.

verschiedener Portionen des auf Lager stehenden Diphterieheilserums gesammelt und dieses Material zur Untersuchung verwendet. Die mikroskopische Untersuchung aller gesammelten Portionen des Serumniederschlages hat vollständig das von Herrn Maillard beschriebene Bild bestätigt. Unter dem Mikroskop waren leicht zu unterscheiden: erstens amorphe, globoide Gebilde, zweitens kugelförmige Körner, die das Licht ziemlich schwach, doch deutlich polarisirten, drittens nadelförmige und blättrige Krystalle, die das Licht stark polarisirten. Die Hauptmasse des Niederschlages bestand aus den globoiden, amorphen — und kugelförmigen krystallinischen Gebilden; das Verhältniss der einen zu den anderen variierte in verschiedenen Portionen. Das Verhalten gegen verschiedene Lösungsmittel, gegen Säuren und Alkalien, stimmte im Allgemeinen mit dem Befund von Herrn Maillard überein und deshalb habe ich mir als erste Aufgabe die Trennung der krystallinischen von den amorphen Bestandtheilen gestellt. Zuerst glaubte ich diese Trennung auf Grund der Verschiedenheit des specifischen Gewichtes der krystallinischen und amorphen Niederschläge zu erlangen und versuchte das Centrifugiren. — Die Methode gab wenig befriedigende Resultate, da die Trennung zu unvollständig war, dabei aber habe ich constatiren können, dass entgegen meiner Erwartung die Schichtenbildung in umgekehrter Reihenfolge erfolgte, d. h. die oberen Schichten waren mehr krystallinisch, die untere mehr amorph. Eine zweite Methode, die ich zur Trennung angewendet habe, war das Auflösen des Niederschlages in den Verdauungssäften, dem Magen- und Pankreassaft, beide nach der Methode von Pawlow gewonnen. Merkwürdig war es, dass nach längerer Einwirkung der beiden Verdauungssäfte auf den Niederschlag sein Bild unter dem Mikroskop unverändert blieb, nur etwas grössere Polarisationsfähigkeit der krystallinischen Aggregate war zu beobachten. Obwohl nun scheinbar der Serumniederschlag unter der Einwirkung der Verdauungssäfte keine Veränderung erlitten hat, so ist in der That seine Natur ganz verändert worden, indem etwa 25—50% der nach der Verdauung zurückgebliebenen Substanz in Alkohol und Aether löslich

geworden ist. Der in Alkohol lösliche Theil sind die Krystallconglomerate, der unlösliche die globoidamorphen Gebilde gewesen. Der aus dem Alkoholextract auskrystallisirte und gereinigte Körper schmolz zwischen 63 und 63,5°, war stickstoff-, schwefel- und phosphorfrei und stellte sich, seiner Zusammensetzung und Eigenschaften nach, als ein Gemisch von Palmitin- und Stearinsäure heraus. Die Elementaranalyse ergab: 0,2520 g der Substanz lieferten 0,6966 g CO₂ und 0,2862 g H₂O, was 75,4% «C» und 12,61% «H» entspricht. Der unverdaute Theil löste sich in verdünnten Alkalien und wurde daraus durch verdünnte Säuren wieder gefällt. Der Körper enthielt Phosphor und Stickstoff und kann mit ziemlich grosser Wahrscheinlichkeit als ein Nuclein angesehen werden. Um eine Vorstellung von der Zusammensetzung des Serumniederschlages zu erhalten, habe ich eine Portion des centrifugirten Niederschlages mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, im Vacuum über SO₄H₂ getrocknet, abgewogen und mit Magensaft der Verdauung unterworfen. Es wurden 2,1340 g Substanz und 100 ccm. Magensaft von der Stärke 3 mm. nach Mette genommen. Nach 24 stündigem Stehen im Thermostaten bei 37,5° C. wurde der unverdaute Theil auf gewogenem Filter gesammelt, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether ausgewaschen, im Vacuum über SO₄H₂ getrocknet und gewogen. Der Verlust an Gewicht betrug 0,6950 g, d. h. 32,56% des Niederschlages sind durch Magensaft resp. Alkohol und Aether gelöst worden. Die Alkohol- und Aetherextracte wurden gesammelt, auf einer gewogenen Schale mit geschliffenem Deckel verdampft, getrocknet und gewogen. Der Rückstand wog 0,5345 g und zeigte die Menge der in Alkohol und Aether löslichen Stoffe an. Es wurden mithin bei der Verdauung nur 0,1605 g (0,6950—0,5345 = 0,1605) Substanz peptonisirt. Demnach bestanden 25,04% aus in Alkohol und Aether löslichen Stoffen und 7,52% sind bei der Verdauung gelöst worden. Eine zweite, auf ähnliche Weise verarbeitete Portion ergab einen Gehalt an 52,4% in Alkohol und Aether löslicher und 18,1 bei der Verdauung peptonisirter Substanzen.

Das auffallende Verhalten des Serumniederschlages gegen

Pankreas und Magensaft liess mich vermuthen, dass wir es hier mit einer Substanz zu thun haben, die ähnlich den Lecithalbuminen von Hoppe-Seyler constituirt ist, mit dem Unterschiede, dass nicht Lecithin, sondern einzig höhere Fettsäuren mit dem Eiweissstoff verbunden sind. Ich habe daher eine abgewogene Menge der auf die oben beschriebene Weise gereinigten und getrockneten Substanz mit 5% Schwefelsäure $\frac{1}{4}$ Stunde lang gekocht. Die nach dem Kochen ungelöst zurückgebliebene Substanz wurde auf gewogenes Filter gebracht, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und gewogen. Ich erhielt 52,7% in Alkohol und Aether löslicher und 10,7% der nach Abspaltung der Fettgruppen zurückgebliebenen Substanz. Das saure, wässrige Filtrat, neutralisirt und mit Fehling'scher Lösung geprüft, ergab volle Abwesenheit reducirender Substanzen. Die abgespaltenen Fettsäuren erwiesen sich mit den früher durch die Verdauung erhaltenen identisch. 0,2023 g Substanz gaben beim Verbrennen 0,2252 g H_2O und 0,5609 g CO_2 , was 12,42% «H» und 75,75% «C» entspricht. Die Formel der Margarinsäure: $C_{17}H_{34}O_2$ verlangt: C 75,55%, H 12,58%.

Das Aussehen des nach der Verdauung unverändert gebliebenen Serumniederschlages einerseits und das Zurückbleiben der globoiden, amorphen Körper nach der nachfolgenden Extraction mit Alkohol anderseits zeigten, dass bei der Verdauung nur der krystallinische Theil der Substanz verändert wurde. Dieser Befund brachte mich auf die Vermuthung, dass der krystallinische, leicht zersetzbare Bestandtheil des Serumniederschlages entweder ein Ester oder ein Salz höherer Fettsäure ist. Der Annahme eines Esters widersprach die Unlöslichkeit der Krystalle in Alkohol und Aether, indessen fand doch vor Kurzem Hürthle¹⁾ im Blutserum solche in Alkohol schwer lösliche Ester der Fettsäuren. 10 g des durch Centrifugiren von Serum befreiten und mit Wasser gewaschenen Niederschlages wurden 14 Tage lang mit kochendem Alkohol extrahirt, wodurch ich etwa 1,5 g des weissen, krystallinischen Körpers

1) K. Hürthle, Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. XXI, S. 331.

gesammelt und zur Elementaranalyse und Charakterisirung des Körpers benutzt habe. Die auf dem Filter gesammelten Kristalle wurden vielmal mit Aether gewaschen, um den Rest des Fettes zu entfernen, in Vacuo über SO_4H_2 getrocknet und analysirt. Die Vorprüfung zeigte, dass die Substanz keinen Stickstoff, Phosphor und Schwefel enthielt, dagegen auf Platinblech verbrannt ziemlich viel Asche, die aus reinem Kalkoxyd bestand, hinterliess. Die Elementaranalyse wurde in offenem Rohre ausgeführt, um das im Platinschiffchen zurückbleibende Calciumoxyd quantitativ zu bestimmen. 0,2014 g Substanz verbrannt gaben 0,2040 g H_2O und 0,5113 g CO_2 , was 11,25% «H» und 69,23% « CO_2 » entspricht. Die in dem Schiffchen zurückgebliebene Asche wurde in verdünnter Salpetersäure gelöst und zur Bestimmung des Kalkes benutzt. Erhalten wurde 0,0204 g « CaO », was 7,19% Ca entspricht. Wenn man annehmen würde, dass der analysirte Körper ein Kalksalz der Margarinsäure von der Formel $(\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_2)_2\text{Ca}$ sei, so sollte er theoretisch folgende Zusammensetzung haben: «C» 70,58%, «H» 11,41%, «Ca» 6,92%. Der erhaltene procentische Gehalt an Wasserstoff und Calcium entspricht dem erwähnten Salze. Der gefundene Kohlenstoffgehalt ist zu niedrig gefunden worden, was leicht dadurch zu erklären ist, dass das im Schiffchen zurückgebliebene Calciumoxyd etwas Kohlensäure zurückgehalten hat. 0,2246 g im Platintiegel verbrannt hinterliessen 0,0223 g CaO , was 7,12% «Ca» entspricht. 0,3256 g Substanz wurden in einem Becherglase mit verdünnter Salzsäure versetzt, abfiltrirt, auf dem Filter ausgewaschen und im Filtrate Kalk als Oxalat bestimmt. Erhalten wurde 0,0323 g CaO , was 7,08% Ca entspricht. Der auf dem Filter zurückgebliebene Körper wurde aus Alkohol umkrystallisirt, getrocknet und darin der Schmelzpunkt bestimmt. Der Schmelzpunkt war 62,2° d. h. stimmte fast vollkommen mit dem der Palmitinsäure überein. Da der palmitinsäure Kalk $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_2)_2\text{Ca}$ «C» 69,81%, «H» 11,27%, «Ca» 7,27% verlangt und der Schmelzpunkt der nach dem Zerlegen des Kalksalzes erhaltenen Säure mit dem der Palmitinsäure übereinstimmt, so ist es sicher, dass das erhaltene Kalksalz palmitinsaurer Kalk war. Die früher ange-

fürten Analysen der freien Säure stimmen besser für Margarin-
säure und nicht für Palmitinsäure, wie aus folgender Zusammen-
stellung ersichtlich :

	Gefunden		Berechnet für	
	1. Analyse	2. Analyse	Margarinsäure $C_{17}H_{34}O_2$	Palmitinsäure $C_{16}H_{32}O_2$
C%	75.4	75,75	75,55	75,00
H%	12,61	12,42	12,58	12,50

Dieser Unterschied in der Zusammensetzung der freien Säure und ihres Kalksalzes kann dadurch erklärt werden, dass bei der Zerlegung der Salze mit Säuren Palmitin- und Stearinsäure frei werden, während bei der Extraction nur das etwas leichter lösliche Kalksalz der Palmitinsäure in Alkohol übergeht und der stearinsäure Kalk ungelöst zurückbleibt. Der sichere Beweis, dass das krystallinische Fibrin des Herrn Maillard ein Calciumsalz der Palmitin- resp. Stearinsäure sei, wäre dann geliefert, wenn nach dem Entfernen dieser Salze durch Extraction des Serumniederschlages mit kochendem Alkohol ein ganz amorpher Rückstand hinterbliebe. Zu diesem Zweck habe ich 0,9933 g Substanz im Extractionsapparate von Schaffner 14 Tage lang ununterbrochen mit kochendem Alkohol extrahirt. Dadurch wurde die Menge der Krystalle etwa auf ein Viertel reducirt. Den Niederschlag vollständig krystallfrei zu erhalten, gelang mir nicht, offenbar nur deshalb, weil stearinsäures Calcium in Alkohol unlöslich ist. Die Substanz hat an Gewicht 0,3699 g verloren. Die 0,3699 g bestehen aus Ester und dem Calciumsalz der Palmitin- resp. Stearinsäure. Die Ester wurden von den fettsauren Salzen durch Waschen mit Aether entfernt und das so gereinigte Kalksalz wieder gewogen. Die Gewichts-differenz vor und nach der Aetherextraction ergab den Gehalt an Kalksalz resp. der Ester. Gefunden wurde 0,1885 g Kalksalz und 0,1814 g Ester. Da aber Serumniederschlag nach 14-tägiger Extraction unter dem Mikroskop noch einen, wenn auch bedeutend verminderten Gehalt, an krystallinischen Gebilden zeigte, so habe ich ihn mit 5%iger Salzsäure ausgelaugt, den Säureüberschuss mit Wasser ausgewaschen und

die freigewordenen Fettsäuren wieder mit Alkohol und Aether extrahirt. Ich erhielt 0,0613 g freie Fettsäure, der Menge des nicht extrahirten Kalksalzes entsprechend. Der jetzt vollkommen krystallfreie Niederschlag = 0,5613 wurde mit 150 ccm. Magensaft 24 Stunden lang verdaut, hierauf von Neuem gewaschen, getrocknet und gewogen. Es ergab sich, dass der Magensaft 0,5050 g Substanz gelöst hat und nur 0,0563 g ungelöstes Nuclein zurückgeblieben sind. Folgende kleine Tabelle veranschaulicht die erhaltenen Resultate.

Portion	Menge der angewandten Substanz in Gramm	Die nach der Verdauung in Alkohol und Aether lösliche Substanzmenge in %	Die durch die Verdauung gelöste Eiweissmenge in %	Der ungelöste Rest in %
I.	2,1340	25,04	7,52	67,44
II.	1,4380	52,40	18,15	29,45
III.	0,7534	52,70	—	10,70
IV.	0,9933	42,89	51,45	5,66

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der Serumniederschlag keine constante Zusammensetzung hat. Der Serumniederschlag besteht aus vier verschiedenen Körpern: 1. dem Kalksalz der höheren Fettsäuren, 2. Glycerin und Cholesterinester dieser Fettsäuren, 3. aus einem Körper, der in Wasser und Salzlösungen unlöslich, vom Magen- und Pankreassaft verdaut und durch Kochen mit verdünnten Säuren löslich wird — dieser Körper könnte das Fibrin sein — 4. aus einem Eiweissstoff, der bei der Verdauung intact bleibt, Phosphor und Stickstoff enthält und als ein Nuclein angesehen werden kann. Da der Serumniederschlag je nach der Dauer der Extraction mit kochendem Alkohol seine weisse Farbe, kalkartige Beschaffenheit und krystallinische Structur verliert, so ist es sicher, dass das krystallinische Fibrin des Herrn Maillard nichts anderes als Kalksalz der Fettsäuren ist. Die Frage, ob überhaupt in dem Serumniederschlag Fibrin vorhanden, betrachte ich als eine noch offene. In meiner vor 3 Jahren im «Wratsch» publicirten Arbeit habe ich die Vermuthung ausgesprochen, dass

die Eiweissstoffe des Serumniederschlages vielleicht langsam sich ausscheidendes Fibrin sein können. Aus Mangel an Material habe ich damals diese Eiweissstoffe nicht untersuchen können und nur deshalb Fibrin vermuthet, weil ich öfters aus dem Serum leukämischer Pferde nach mehrtägigem Stehen ziemlich grosse Fibrinmengen, immer von Neuem, sich ausscheiden sah. Schliesslich muss ich bemerken, dass die jetzt von mir erhaltenen Resultate nicht ganz mit den früher erhaltenen und im «Wratsch» publicirten übereinstimmen. Ich erhielt jetzt viel weniger Cholesterinester, was ich mir dadurch erkläre, dass die genannten Ester zuerst ausgefallen sind und schon früher, d. h. vor dem Aufbewahren in zugeschmolzenen Flacons, des auf seine Stärke geprüften Serums abfiltrirt wurden.

Ueber die Harnstoffbestimmung im Harn.

Von

S. Salaskin und J. Zaleski.

Mit einer Abbildung.

(Aus dem Laboratorium des Prof. M. Nencki in Petersburg.)

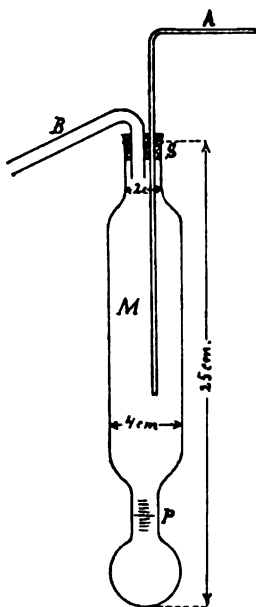
(Der Redaction zugegangen am 25. Juni 1899.)

Anlässlich einer Untersuchung über die Zusammensetzung des Harns von Büffeln benutzten wir zur Harnstoffbestimmung die Methode von K. Mörner und J. Sjöqvist¹⁾. Die nach dieser Methode gewonnenen Resultate gaben überaus hohe Zahlen, und die mikroskopische Untersuchung des Rückstandes der filtrirten alkoholisch-ätherischen Lösung zeigte darin die Anwesenheit von Hippursäure. Wir haben daher das Verfahren von Mörner und Sjöqvist derart abgeändert, dass der nach dem Abdampfen von Aetheralkohol erhaltene Rückstand in zugeschmolzenen Glasröhren, um Harnstoff zu zerlegen, erhitzt, das dabei gebildete Ammoniak abdestillirt und aus dem gefundenen Ammoniak der Harnstoff berechnet wurde.

Unser Verfahren ist folgendes: 5 ccm. Harn werden in einer Flasche mit engem Hals und eingeschlifffenem Stöpsel mit 5 ccm. Barytmischung versetzt. Die Barytmischung ist eine gesättigte Chlorbaryumlösung mit 5% Baryumhydrat. Der Mischung werden 75 ccm. eines Gemisches von 1 Theil Aether und 2 Theilen Alkohol von 90% zugesetzt. Die Flasche wird

1) K. A. H. Mörner und J. Sjöqvist. Skandin. Arch. 2, 440.
E. Bödtker, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 146.
G. Töpfer, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1897.

bis zum folgenden Tag verschlossen aufbewahrt. Dann wird die Flüssigkeit, unter Benutzung der Wasserstrahlpumpe, in das unten kugelförmige Gefäß M (siehe nebenstehende Figur) filtrirt und der Niederschlag mit Aetheralkohol gewaschen. Dasselbe Gefäß wird auch zum Abdestilliren von Aetheralkohol und zur nachfolgenden Vertreibung des Ammoniaks unter vermindertem Druck verwendet; es soll also dickwandig genug sein, um den Atmosphärendruck auszuhalten. Die untere Kugel des Gefäßes M fasst 25 ccm., sein Hals, von 8 mm. Durchmesser, ist seiner Länge nach von 24 bis 26 ccm. in Zehntel-Cubikcentimeter getheilt. Auf der Figur sind alle Dimensionen des Gefäßes M gezeigt; sein Volumen entspricht ungefähr 150 ccm.



Um das heftige Stossen bei der Destillation zu vermeiden, leitet man durch das Rohr A, welches am Ende verjüngt ist, einen schwachen Luftstrom. Dieses Rohr kann man im Kautschukpfropfen s so heben oder senken, dass sein unteres Ende 1 bis 2 cm. von der Oberfläche der Flüssigkeit im Gefäße M sich befindet. Die durchgeleitete Luft soll ganz trocken und warm sein. Deswegen passiert sie zuerst einige mit Schwefelsäure gefüllte Waschflaschen, dann ein leeres Reservoir, welches auf 80 bis 90°

erwärmt ist. Alle Waschflaschen, Reservoir und Rohr A sind mittelst dickwandiger Kautschukröhren mit einander verbunden. Ein Glashahn oder ein Kautschukschlauch mit Bunsen'scher Klemme dienen zur Regulirung des Luftstromes.

Das Gefäß M steht während der Destillation in einem höchstens auf 40° erwärmten Wasserbade. Das weitere Rohr B, von 6 mm. Durchmesser, ist mit einem Kühler, um die Dämpfe

möglichst zu condensiren, verbunden; dann folgt eine Vorlage, welche das Destillat aufnimmt; sie ist direkt mit der Wasserstrahlpumpe verbunden. Mit einem und demselben Kühler und derselben Vorlage können 4 Gefässe von der Form M verbunden, d. h. es können 4 verschiedene Bestimmungen auf einmal ausgeführt werden; auch das Heissreservoir und die Waschflaschen dienen gemeinschaftlich für alle 4 Bestimmungen. Bei einem Drucke von 50–30 mm. kann die Flüssigkeit im Gefässe M auf ein kleines Volumen von 10 ccm. in 6–8 Stunden eingeengt werden.

Dann setzt man 0,2–0,3 g gebrannter Magnesia hinzu, spült sorgfältig die Wände des Gefässes M mit Wasser ab, und unter demselben Luftdrucke und im Luftstrome wird das Ammoniak abdestillirt. Nach 4–6 Stunden, wenn die Flüssigkeit von Neuem auf ein Volumen von ungefähr 10 ccm. gebracht ist, werden 4 ccm. Salzsäure von 1,124 Dichte hinzugesetzt. Mit dieser sauren Flüssigkeit werden die Wände abgespült, wobei das Gefäss M horizontal gedreht wird, was wegen seiner Form leicht, ohne etwas von der Flüssigkeit zu verlieren, auszuführen ist. Hernach wird das Gefäss M senkrecht gestellt, seine Wände mit so viel destillirtem Wasser, um die ganze Kugel beinahe bis zum unteren Striche des Halses zu füllen, nachgespült und ein paar Stunden am kühlen Orte stehen gelassen. Die Flüssigkeit benetzt dann ganz gleichmässig die Kugel und keine Tropfen bleiben an der Wand haften. Nöthigenfalls werden aus einer Pipette noch ein paar Tropfen Wasser hinzugesetzt und der Stand der Flüssigkeitsoberfläche auf der Skala des Halses notirt. Die Flüssigkeit wird im Gefässe umgeschüttelt, daraus mittelst einer Pipette 10, 15 oder 20 ccm. entnommen und in einer Einschmelzröhre 3 Stunden lang auf 130–140° erhitzt.

Bei unseren Bestimmungen nahmen wir immer 10 ccm. der Flüssigkeit, weil es für uns wichtig war, Parallelversuche auszuführen. In anderem Falle ist es empfehlenswerth, mehr zu nehmen, weil, je geringer die angewendete Menge der Flüssigkeit ist, mit um so grösseren Coëfficienten der Beobachtungsfehler multiplicirt wird.

Nach dem Erkalten öffnet man das Glasrohr, bringt die Flüssigkeit in einen Destillirkolben, spült das Rohr mit Wasser nach, macht mit 2 g Magnesiumoxyd alkalisch und destillirt das gebildete Ammoniak in ein abgemessenes Volumen $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure ab. Die freie Säure wird mit $\frac{1}{20}$ Normal-Kalilauge zurücktitirt. Als Indicator gebrauchten wir eine Mischung von Lacmoid und Malachitgrün — sie wird durch Auflösen von 10 g Lackmoid in 150 ccm. Alkohol bereitet; die Lösung wird filtrirt und mit 10 bis 15 ccm. einer Lösung von 1 g Malachitgrün in 50 ccm. Alkohol vermischt. Wir finden diese Combination viel empfindlicher, als die von Förster vorgeschlagene.¹⁾

Zum Abtreiben des Ammoniaks wurde Magnesiumoxyd aus folgenden Gründen gewählt: 1. es treibt aus der Lösung beim Kochen alles Ammoniak aus, 2. es zerlegt Harnstoff nicht mehr als kochendes destillirtes Wasser und 3) es vermindert das Stossen bei der Destillation. Folgende Versuche bestätigen das Gesagte.

Es wurde eine Lösung von chemisch-reinem Harnstoff dargestellt, welche in 10 ccm. 84,96 mg Harnstoff enthielt. 10 ccm. von dieser Lösung wurden mit 100 ccm. 25 %iger Natronlauge und 200 ccm. Wasser auf $\frac{1}{4}$ abdestillirt. Die Menge des zerlegten Harnstoffes betrug 16,6 mg, d. h. 19,5% der gewonnenen Quantität. Parallele Versuche mit anderen Substanzen gaben folgende Zahlen:

mit 25 g Ba(OH) ₂	—	10,89 mg	$\frac{+}{U}$	=	12,8%
• 20 • MgO	—	3,42 •	$\frac{+}{U}$	=	4,0%
• 2 • MgO	—	2,02 •	$\frac{+}{U}$	=	2,4%
• Wasser	—	2,17 •	$\frac{+}{U}$	=	2,5%.

Aus einer Lösung von Ammoniumsulfat, welche bei der Destillation mit Natronlauge in zwei parallelen Versuchen die Zahlen 11,19 und 11,23 mg N in 10 ccm. der Lösung gab, wurden folgende Resultate erhalten:

Destillation mit 2 g MgO	—	11,19 mg N
• 1 • MgO	—	11,19 • N.

¹⁾ Landw. Versuchsst. Bd. XXXVIII.

Genau dieselben Zahlen fanden wir bei der Destillation von 10 ccm. dieser Lösung mit 2 g MgO im Vacuum; das Sieden wurde 3 Stunden unterhalten, wobei man die Temperatur auf 35% steigen liess. Deswegen haben wir auch das Magnesiumoxyd für Ammoniakbestimmung im Harn nach der von Prof. M. Nencki gemeinschaftlich mit einem von uns¹⁾ vorgeschlagenen Methode angewandt. Die Parallelbestimmungen im Büffelharn gaben identische Resultate mit MgO, wie mit Ca(OH)₂. Ein dreistündiges Kochen im Vacuum bei 29° bis höchstens 35° genügt zur vollständigen Austreibung des Ammoniaks. Wir haben dies auf diese Weise ermittelt, dass das entweichende Ammoniak in einzelnen Portionen aufgefangen wurde. 30 ccm. von unserer Ammoniumsulfatlösung wurden mit 3 g MgO im Vacuum destillirt. Nach der Evacuirung bei 18° wurden 0,34 mg N = 1,0% der ganzen Menge gefunden. Bei 29°, wobei die Flüssigkeit zu sieden begann — 13,22 mg N = 39,3%. Jede Stunde wird nun das entweichende Ammoniak bestimmt:

nach 1 Stunde bei	31,5°	—	15,66 mg N =	46,6 %
" 1 " "	32°	—	3,15 " N =	9,4 "
" 1 " "	32°	—	1,10 " N =	3,3 "

In Summa 33,47 mg N anstatt der genommenen 33,63 mg. (Eine detaillirte Beschreibung des analogen Versuches in der citirten Arbeit s. S. 390).

Die ersten Harnstoffbestimmungen nach der oben beschriebenen Methode wurden mit reinen Harnstofflösungen ausgeführt. Die $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure, welche wir bei unseren Versuchen benutzten, enthielt im Liter 4,000 g SO₃; 10 ccm. davon entsprachen 20,05 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Kalilauge. Es entsprach 1 ccm. der Kalilauge: 1,995 mg SO₃ respective 0,8478 mg NH₃ — 0,6982 mg N — 1,496 mg $\overset{+}{U}$. Die Harnstofflösung enthielt, wie erwähnt, 84,96 mg $\overset{+}{U}$ in 10 ccm.

5 ccm. von dieser Lösung wurden nach Mörner und Sjöqvist mit Baryummischung versetzt und dann mit Schwefel-

¹⁾ Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. XXXVI, S. 385.

säure verbrannt. In die Vorlage wurden 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 gebracht.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Bei der Titration — 1,8 „ verbraucht

$$\begin{array}{r} 28,28 = 42,31 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}} \end{array}$$

$$84,62 \text{ „ } \overset{+}{\text{U}} \text{ in 10 ccm.}$$

Um das starke Stossen beim Verbrennen mit Schwefelsäure zu vermeiden, ist es nothwendig, bei diesen Bestimmungen 10 g Kaliumsulfat der Flüssigkeit zuzusetzen.

Dieselbe Harnstofflösung wurde nach unserer Methode bestimmt.

Genommen 5 ccm., angesäuert mit 1 ccm. concentrirter H_2SO_4 ¹⁾; nach dem Abdampfen die Flüssigkeit auf 25,0 ccm. gebracht; davon 10 ccm. genommen, im Rohre erhitzt, dann destillirt.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 18,8

$$\begin{array}{r} 11,28 = 16,88 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}} \end{array}$$

$$84,40 \text{ „ } \overset{+}{\text{U}} \text{ in 10 ccm.}$$

Paralleler Versuch. 5 ccm. der Lösung, wie oben mit H_2SO_4 angesäuert. Auf 25,8 ccm. gebracht. Davon 10 ccm. überdestillirt.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 19,15

$$\begin{array}{r} 10,93 = 16,35 \end{array}$$

$$84,37 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}} \text{ in 10 ccm.}$$

Die Abweichungen der einzelnen Analysen bewegen sich innerhalb der Fehlergrenzen.

Um uns zu überzeugen, dass der Harnstoff beim Erhitzen in zugeschmolzenen Röhren in einer saueren Lösung vollständig

1) Wir haben in den meisten Fällen den nach Abdampfen des Alkohol-Aethers erhaltenen Rückstand, um darin den Harnstoff zu zersetzen, mit 4 ccm. Salzsäure vom sp. Gew. 1,124 auf 130—140° erhitzt. In 4 Fällen haben wir statt der 4 ccm. HCl 1 ccm. conc. H_2SO_4 angewendet. Die Resultate fallen auch damit richtig aus. Dabei entsteht jedoch eine Trübung von schwefelsaurem Baryum und es ist zweckmässiger, lieber HCl anzuwenden.

zersetzt wird, wurden 10 ccm. von der obigen Lösung mit 0,5 ccm. Salzsäure (1,124) im Rohre drei Stunden auf 130 bis 140° erhitzt, dann mit 2 g Mg O destillirt.

Vorlage 30 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 60,15 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 3,35

$$\frac{56,8}{3,35} = 84,98 \text{ mg } \overset{+}{\text{U}} \text{ in 10 ccm.}$$

Wir lassen jetzt Harnstoffbestimmungen in Harnen von verschiedenen Thierspecies folgen.

Hundeharn.

I. Portion. Gesamtstickstoff wurde nicht bestimmt. Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist. 5 ccm. Harn genommen.

Vorlage 130 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 260,65 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 24,8

$$\frac{235,85}{24,8} = 164,7 \text{ mg N}$$

$$3,294 \text{ g N Proc.}$$

Harnstoffstickstoff nach unserer Methode. 5 ccm. Harn. Angesäuert mit 1 ccm. conc. H₂ SO₄. Gebracht auf 25,0 ccm. Davon 10 ccm. in zugeschmolzenem Rohr erhitzt und hernach destillirt.

Vorlage 60 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 120,30 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 29,15

$$\frac{91,15}{29,15} = 63,63 \text{ mg N}$$

$$3,182 \text{ g N Proc.}$$

Der nach der Destillation erhaltene Rest wurde mit 20 ccm. conc. H₂SO₄ und 10 g K₂SO₄ verbrannt und mit überschüssiger Natronlauge destillirt. Der auf diese Weise gefundene Stickstoff gehört den Substanzen, welche durch Alkohol-Aether extrahirbar, aber nicht auf Harnstoff zu beziehen sind.

Vorlage 25 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 50,13 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 45,2

$$\frac{4,93}{45,2} = 3,44 \text{ mg N}$$

$$0,172 \text{ g N Proc.}$$

Summa: 3,182 + 0,172 = 3,354 ist mit dem Resultate, welches nach der Methode von Mörner-Sjöqvist erhalten ist, zu vergleichen.

Paralleler Versuch nach neuerer Methode. 5 ccm. Harn.

Angesäuert mit 1 ccm. H_2SO_4 . Gebracht auf 25,9 ccm. Davon 10 ccm. genommen.

Vorlage 60 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	120,30 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	33,15
	<hr/>
	87,15 = 60,84 mg N
	3,152 g N Proc.

Der Rest wurde, wie früher, mit H_2SO_4 verbrannt und mit NaOH destillirt.

Vorlage 25 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	50,13 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	45,35
	<hr/>
	4,78 = 3,34 mg N
	0,173 g N Proc.

Summa: 3,152 + 0,173 = 3,325.

Hundeharn.

II. Portion. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl. 5 ccm. Harn.

Vorlage 75 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	150,38 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	43,65
	<hr/>
	106,73 = 74,52 mg N
	1,490 g N Proc.

Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist. 5 ccm. Harn.

Vorlage 50 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	100,25 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	1,4
	<hr/>
	98,85 = 69,02 mg N
	1,380 g N Proc. = 92,6% des Gesamtstickstoffes.

Harnstoffstickstoff nach unserer Methode. 5 ccm. Harn, gebracht auf 25,3 ccm., davon zwei Portionen zu 10 ccm. genommen.

a) Vorlage 30 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	60,15 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	22,75
	<hr/>
	37,40 = 26,11 mg N
	1,321 g N Proc. = 88,7%.

Der Rest wurde mit H_2SO_4 verbrannt und mit NaOH überdestillirt.

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10} \text{SO}_3$ —	20,05 ccm. $\frac{1}{10} \text{KOH}$
Titration	18,00
	<hr/>
	2,05 = 1,43 mg N
	0,072 g N Proc.

Summa: $1,321 + 0,072 = 1,393$.

b) Vorlage 30 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 60,15 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 23,6

36,55 = 25,52 mg N

1,291 g N Proc. = 86,6%.

Menschenharn.

I. Portion. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl. 5 ccm. Harn.

Vorlage 50 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 100,25 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 39,00

61,25 = 42,78 mg N

0,856 g N Proc.

Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist. 5 ccm. Harn.

Vorlage 30 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 60,15 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 4,05

56,10 = 39,17 mg N

0,783 gr. N Proc. = 91,5%.

Harnstoffstickstoff nach unserer Methode. 5 ccm. Harn,
gebracht auf 25,1 ccm., davon genommen zwei Portionen zu
10 ccm.

a) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 10,35

19,73 = 13,78 mg N

0,692 g N Proc. = 80,8%.

Der Rest verbrannt und noch einmal destilliert.

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 20,05 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 18,35

1,70 = 1,19 mg N

0,060 g N Proc.

Summa: $0,692 + 0,060 = 0,752$.

b) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 10,25

19,83 = 13,85 mg N

0,695 g N Proc. = 81,2%.

II. Portion. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl. 5 ccm. Harn.

Vorlage 50 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 100,25 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 18,65

81,60 = 56,98 mg N

1,140 g N Proc.

Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist. 5 ccm. Harn.

Vorlage 50 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 100,25 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 26,6

73,65 = 51,42 mg N

1,028 g N Proc. = 90,2%.

Harnstoffstickstoff nach unserer Methode. 5 ccm. Harn,
gebracht auf 25,0 ccm., davon 10 ccm. genommen.

Vorlage 20 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 40,1 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 12,5

27,6 = 19,27 mg N

0,964 g N Proc. = 84,7%.

Büffelharn.

I. Portion. Gesamtstickstoff wurde nicht bestimmt.
Harnstoffstickstoff. 5 ccm. Harn, bearbeitet nach unserer Methode.
Die Lösung gebracht auf 25,0 ccm. Davon genommen zwei
Portionen zu 10 ccm. Eine verbrannt mit H₂SO₄ nach Mörner-
Sjöqvist. Andere im Rohre erhitzt.

a) mit H₂SO₄ verbrannt.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 6,8

23,28 = 16,26 mg N

0,813 g. N Proc.

b) im Rohre erhitzt.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 16,15

13,93 = 9,73 mg N

0,486 g N Proc.

II. Portion. Büffelharn.

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl. 5 ccm. Harn.

Vorlage 50 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 100,25 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 49,6

50,65 = 35,37 mg N

0,707 g N Proc.

Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist. 5 ccm. Harn.

Vorlage 25 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 50,13 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 5,4

44,73 = 31,23 mg N

0,625 g N Proc. = 88,4%.

Harnstoffstickstoff nach neuer Methode. 5 ccm. Harn, gebracht auf 25,5 ccm. Davon wurden zwei Portionen zu 10 ccm. genommen.

a) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 18,95

11,13 = 7,77 mg N

0,396 g N Proc. = 56,0%.

b) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 18,7

11,38 = 7,95 mg N

0,405 g N Proc. = 57,3%.

Der Rest wurde verbrannt und noch einmal destillirt.

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 20,05 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 14,1

5,95 = 4,16 mg N

0,212 g N Proc.

Summe: 0,405 + 0,212 = 0,617.

Parallele Bestimmung in demselben Harne nach unserer Methode. 5 ccm. Harn gebracht auf 25,0 ccm., davon 10 ccm. genommen.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 18,85

11,23 = 7,84 mg N

0,392 g N Proc. = 55,5%.

Analyse des Restes.

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 20,05 ccm. $\frac{1}{100}$ KOH

Titration 13,4

6,65 = 4,64 mg N

0,232 g N Proc.

Summa: 0,392 + 0,232 = 0,624.

Die so grossen Differenzen in den nach verschiedenen Methoden erhaltenen Resultaten veranlassten uns, den Harnstoff im Büffelharne auch nach Schöndorff zu bestimmen.

III. Portion. Büffelharn.

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl. Zwei parallele Versuche gaben die Zahlen 0,499 und 0,495 g N Proc., im Mittel 0,497 g N Proc.

Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjögqvist in 5 ccm. Harn.

Vorlage 20 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 40,10 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 10,8

29,3 = 20,46 mg N

0,409 g N Proc. = 82,3%.

Harnstoffstickstoff nach unserer Methode. 5 ccm. Harn,
auf 25,0 ccm. gebracht, davon zwei Portionen zu 10 ccm.
genommen.

a) Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 20,05 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 14,65

5,40 = 3,77 mg N

0,189 g N Proc.

b) Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 20,05 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 14,6

5,45 = 3,81 mg N

0,190 g N Proc.

Im Mittel: 0,189 g N Proc. = 38,1% des Gesamtstickstoffs.

Harnstoffstickstoff nach Schöndorff. 50 ccm. Harnes
wurden mit 450 ccm. Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung
versetzt. Nach dem Verreiben mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wird die Flüssigkeit
filtrirt (Filtrat II)¹⁾ und abgemessene Menge mit krystallisirter
Phosphorsäure auf 150° erhitzt.

a) 50 ccm. des Filtrates II = 5 ccm. Harn.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 15,05

15,03 = 10,49 mg N

0,210 g N Proc.

b) 50 ccm. des Filtrates II = 5 ccm. Harn.

Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO_3 — 30,08 ccm. $\frac{1}{20}$ KOH

Titration 14,95

15,13 = 10,56 mg N

0,211 g N Proc.

Im Filtrate II wird auch präformirtes Ammoniak nach
der Methode von Nencki und Zaleski bestimmt. In 100 ccm.
des Filtrates = 10 ccm. des Harnes gefunden 0,27 mg N, resp.
0,003 g N Proc.

Also im Mittel für Harnstoffstickstoff ist die Zahl 0,208 g

1) R. Schöndorff, Pflüger's Archiv, Bd. LXII.

N Proc. anzunehmen. Das bildet 41,9% des Gesamtstickstoffes.

Mit dem Filtrate II haben wir zwei Parallelbestimmungen durch Erhitzen mit 2 ccm. HCl in zugeschmolzenen Röhren auf 130—140° ausgeführt. Zu jeder Probe wurden 15 ccm. des Filtrates genommen. Eine wird mit NaOH, die andere mit MgO destillirt. Die erste gab folgendes Resultat:

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 20,05 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 15,3

4,75 = 3,32 mg N

0,221 g N Proc.

Die zweite Destillation mit MgO:

Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 20,05 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 15,6

4,45 = 3,11 mg N

0,207 g N Proc.

Im Mittel 0,214 g N Proc., nach Abzug des präformirten Ammoniaks: 0,211 g N Proc. = 42,5% des Gesamtstickstoffes.

25 ccm. des Filtrates II wurden nach Kjeldahl mit H₂SO₄ verbrannt, um den Gesamtstickstoff der Substanzen, welche durch Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung aus dem Büffelharn nicht fällbar sind, zu ermitteln.

Bei der Titration gefunden 10,72 mg N, was 0,429 g N Proc. und 86,3% des Gesamtstickstoffes entspricht.

Dieser Harn wird direkt mit HCl im zugeschmolzenen Rohre erhitzt und das gebildete Ammoniak mit NaOH überdestillirt. Es wurden 5 ccm. Harn mit 5 ccm. destillirten Wassers und 2 ccm. Salzsäure von 1,124 3 Stunden auf 130 bis 140° erhitzt.

Bei der Destillation wurde erhalten:

Vorlage 35 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 70,18 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 54,65

15,53 = 10,84 mg N

0,217 g N Proc.

Von dieser Zahl ist das Ammoniak, das nach der Methode von Nencki und Zaleski bestimmt wurde, abzuziehen. Zwei Parallelversuche gaben folgende Resultate:

- a) 15 ccm. Harn mit Kalkmilch destillirt: 1,05 mg N respective 7,00 mg N Proc.
 b) 15 ccm. Harn mit 2 g MgO destillirt: 1,03 mg N respective 6,87 mg N Proc.

Im Mittel: 6,94 mg N Proc. Auf diese Weise ist die Zahl $0,217 - 0,007 = 0,210$ mg N Proc. auf Harnstoffstickstoff zu beziehen; das macht 42,3% des Gesamtstickstoffes aus.

Dieses letzte Verfahren gibt also Resultate, welche sich von den nach unserer und nach Schöndorff'scher Methode erhaltenen wenig unterscheiden. Auf Veranlassung von Prof. Nencki ist in unserem Laboratorium Herr Magister Meissel mit der genaueren Ausarbeitung dieses Verfahrens beschäftigt und wird seine Untersuchungen hierüber veröffentlichen.

Wir haben auch unsere Methode für Harnstoffbestimmung im Liebig'schen Fleischextracte angewendet. Die 5% Lösung wurde 1 Stunde gekocht. Gesamtstickstoff nach Kjeldahl: 0,525 g N Proc.

Das Verfahren nach MörnerSjöqvist gab 0,285 g N Proc. d. h. 54,3% des Gesamtstickstoffes.

Nach unserer Vorschrift wird die Lösung auf 25,0 ccm. gebracht; davon zwei Portionen zu 10 ccm. genommen.

- a) Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 20,05 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH
 Titration 19,8
 $\underline{\hspace{1cm}}$
 0,25 = 0,17 mg N
 0,009 g N Proc.
 b) Vorlage 10 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 20,05 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH
 Titration 19,7
 $\underline{\hspace{1cm}}$
 0,35 = 0,24 mg N
 0,012 g N Proc.

Im Mittel: 0,010 g N Proc. respective 1,9% des Gesamtstickstoffes. Natürlich ist es eine Frage, ob man diese Zahl auf Harnstoff, welcher im Extracte sich befinden könnte, beziehen darf.

Nach der Methode von Schöndorff wurden 50 ccm. der Lösung mit 850 ccm. Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung versetzt. 50 ccm. des Filtrates II mit krystallisirter Phosphorsäure erhitzt.

a) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08 ccm. $\frac{1}{10}$ KOH

Titration 28,8

1,28 = 0,89 mg N

0,032 g N Proc.

b) Vorlage 15 ccm. $\frac{1}{10}$ SO₃ — 30,08

Titration 28,6

1,48 = 1,03 mg N

0,037 g N Proc.

Im Mittel: 0,035 g N Proc., nach Abzug des präformierten Ammoniak 0,033 g N Proc. = 6,3 % des Gesamtstickstoffes.

30 ccm. von dem Filtrate II gaben bei der Verbrennung nach Kjeldahl 2,67 mg N = 0,160 g N Proc. d. h. 30,5 % des Gesamtstickstoffes in der Lösung des Liebig'schen Fleisch-extractes werden von Phosphorwolframsäure nicht gefällt.

Aus unserer Untersuchung geht also hervor, dass die ursprüngliche Mörner-Sjöqvist'sche Methode für Harnstoffbestimmungen im Harne wenig geeignet ist, da die dafür erhaltenen Zahlen zu hoch sind. Im Vergleiche mit unserer Modification resp. mit dem Verfahren von Schöndorff wurden die geringsten Differenzen für Hundeharn erhalten. Schon grösser sind sie beim Menschenharn, und für hippursäurehaltige Harne der Pflanzenfresser ist diese Methode ganz unbrauchbar, da fast doppelt so viel Harnstoff gefunden wird, als in Wirklichkeit darin vorhanden ist.

Ueber das Antipepton.¹⁾

(Mittheilung III.)

Von

Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 28. Juni 1899.)

In meiner zweiten Abhandlung über das « Antipepton » habe ich mich eingehender mit dem Antipepton beschäftigt, das sich nach der Methode Balke's²⁾ darstellen lässt, und nachgewiesen, dass es aus einem Gemenge bestehen muss, welches sich durch Phosphorwolframsäure in zwei Haupttheile zerlegen lässt, einen durch Phosphorwolframsäure fällbaren basenreichen und einen durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, der die den Basen correspondirenden Säuren zu enthalten scheint.

Bei der Auflösung des basenreichen Theiles des Balke'schen Antipeptons musste ich nach Gewinnung von Histidin und Arginin Halt machen, da die damals bekannten Methoden für die Isolirung des Lysins versagten. Inzwischen war von Kossel³⁾ ein Verfahren ausgearbeitet, das gestattet, das Lysin in Form seines schwer löslichen Pikrates darzustellen. Nach dem Bekanntwerden dieser Methode nahm ich meine Versuche zur Isolirung des Lysins aus dem Antipepton Balke's wieder auf. Ich entfernte deshalb aus der silberhaltigen Flüssigkeit, die das Lysin enthalten musste, das Silber in der Kälte durch Salzsäure und die letzten Theile des Baryts durch Schwefelsäure, filtrirte vom entstandenen Nie-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 110.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 248.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 586.

derschlag ab und fällte das Filtrat von Neuem mit Phosphorwolframsäure. Die voluminöse Fällung wurde abgesaugt, sorgfältig mit kaltem Wasser gewaschen und zweimal aus siedendem Wasser umkrystallisirt. Nach der zweiten Umkrystallisation fiel die Phosphorwolframverbindung in schon makroskopisch erkennbaren Nadeln aus. Diese letzte Fällung wurde von mir verarbeitet. Ich saugte sie ab, wusch sie noch etwas mit Wasser aus, schwemmte sie in Wasser auf, erwärmte auf 50° C. und zersetzte sie vorsichtig mit Baryt unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses. Von den entstandenen unlöslichen Barytverbindungen wurde abfiltrirt, aus dem Filtrat mit Kohlensäure der überschüssige Baryt entfernt und dasselbe zum dünnen Syrup concentrirt. Aus demselben liess sich nach der Methode Kossel's ohne Schwierigkeit ein Pikrat darstellen, das bei der Analyse nachstehende Zahlen lieferte:

Es gaben bei der Verbrennung 0,2065 g Substanz 0,290 g Kohlensäure und 0,0852 Wasser.

Für $C_6H_{14}N_8O_2 \cdot C_6H_5N_3O_7$

Berechnet:

C = 38,40 %

H = 4,53 %

Gefunden:

C = 38,31 %

H = 4,62 %

Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug 25,3 g entsprechend 9,85 g freiem Lysin.

Ferner versuchte ich den sauren Antheil des Balke'schen Antipeptons weiter aufzulösen. Aus demselben hatte ich ca. 8 g eines Säuregemisches isolirt, aus dem sich durch Krystallisation 2,33 g einer annähernd reinen Asparaginsäure gewinnen liess. Die Reste der in den Mutterlaugen enthaltenen Asparaginsäure schied ich dadurch aus, dass ich dieselben mit kohlensaurem Kupfer erhitze, filtrirte und stark concentrirte. Es krystallisirte nun das charakteristische Kupfersalz der Asparaginsäure. Die stark kupferhaltige Mutterlauge des asparaginsäuren Kupfers dagegen setzte freiwillig keine Krystallisation mehr ab, sondern dichte zum Syrup ein. Denselben nahm ich daher wieder mit Wasser auf und fällte ihn nach den Angaben von Hlasiwetz und Habermann¹⁾ mit Bleiessig unter Vermeidung eines Ueber-

1) Liebig's Annalen, Bd. 169, S. 150.

schusses. Die reichliche Bleifällung wurde abfiltrirt und das noch tiefblaue Filtrat vom Blei und Kupfer durch Schwefelwasserstoff befreit. Nach Entfernung der Metallsulfide schied die stark concentrirte Flüssigkeit eine geringe Menge harter glänzender Krystalle ab. Dieselben liessen sich ohne Schwierigkeit in die charakteristische salzsaure Verbindung der Glutaminsäure überführen. Die Ausbeute betrug ca. 0,130 g.

Davon gaben 0,122 g, 0,0965 g AgCl.

Für $C_6H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:

Cl = 19,34%

Gefunden:

Cl = 19,56%

Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 195°C (uncorrig.). Für salzsaure Glutaminsäure wird der Schmelzpunkt zu 193°C. angegeben.

Die durch Schwefelwasserstoff zersetzte Bleifällung gab einen Syrup, der nach Zusatz von Salzsäure gleichfalls Krystalle abschied. Leider ging mir durch einen Unfall dieser Theil verloren.

Als einen weiteren krystallinischen Körper, den ich aus dem Antipepton Balke's darzustellen vermochte, habe ich in meiner zweiten Mittheilung¹⁾ über das Antipepton das neutrale Nitrat einer bisher unbekannten Base angeführt. Ueber diese Verbindung kann ich zur Zeit nähere Aufklärungen geben. Sie stellt die neutrale Salpetersäureverbindung eines bisher unbekannten, nämlich eines optisch inactiven Arginins dar.

Das Salz krystallisirt im Gegensatz zum rechtsdrehenden wasserfrei in kleinen, glänzenden, klaren, vierseitigen Säulen oder Tafeln, die häufig zu kleinen Drusen vereinigt sind. Seine wässerige Lösung reagirt vollkommen neutral.

Von der analysenreinen Verbindung lösen sich bei 20°C. 0,116 g in 2 ccm. Wasser, also in 100 Theilen Wasser nur 5,8 Theile, während von dem bisher bekannten rechtsdrehenden Argininnitrat 100 Theile²⁾ Wasser 50 Theile bei einer Temperatur von 16°C. zu lösen vermögen.

Wie die Löslichkeit, so weicht auch der Schmelzpunkt

¹⁾ S. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 114.

²⁾ S. G. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 156.

des inactiven Argininnitrates von dem des rechtsdrehenden wesentlich ab. Das inactive Argininnitrat sintert erst bei 206°C. , ist vollkommen geschmolzen bei 211°C. und zersetzt sich gleichzeitig bei dieser Temperatur unter Blasenbildung, während das rechtsdrehende Argininnitrat nach Gulewitsch¹⁾ schon bei 175°C. unter Zersetzung zusammensintert.

Die eigenartige Isolirung und die eben geschilderten stark abweichenden physikalischen Verhältnisse des inactiven Argininnitrates hatten mich veranlasst, in demselben das salpetersaure Salz einer gänzlich unbekannten Base zu vermuthen, bis die erst später von mir ausgeführten Analysen die unerwartete Aufklärung gaben.

Analytische Belege.

0,177 g der lufttrockenen Substanz verloren bei 120°C. nur 0,4 mg an Gewicht. Die vorher über Schwefelsäure getrockneten, zur Verbrennung bestimmten Substanzmengen dagegen verloren bei 120°C. nichts an Gewicht. Das inactive Argininnitrat krystallisirt also ohne Krystallwasser.

Eine Lösung von 1,781% beeinflusste im 6 d-Rohr das polarisirte Licht nicht. (S. die entsprechenden Versuche von Gulewitsch mit rechtsdrehendem Argininnitrat in dieser Zeitschrift, Bd. 27, S. 190.)

Bei der Verbrennung gaben 0,1985 g Substanz 0,2226 g Kohlensäure und 0,1168 g Wasser.

Bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung lieferten 0,1582 g Substanz 40,6 ccm. Stickstoff bei 15°C. und 750,5 mm. Barometerstand.

0,152 g gaben bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung 39,2 ccm. Stickstoff bei 16°C. und 752 mm. Barometerstand.

Gefunden:		Berechnet für:
I.	II.	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8, \text{HNO}_3$.
C = 30,59%	—	C = 30,38%
H = 6,58%	—	H = 6,33%
N = 29,83%	29,90%	N = 29,54%

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 190.

Gegen meine Arbeit sind, soweit sie gegen das Antipepton Balke's gerichtet ist, von Siegfried¹⁾ Einwände erhoben worden. Namentlich ist von ihm mein Ausgangsmaterial, das Antipepton, das ich genau nach der Vorschrift Balke's gewonnen hatte, bemängelt worden, indem er meine Ausbeute als unverhältnissmässig hoch hingestellt hat.

Ich werde in der folgenden Darlegung zeigen, dass sie nicht höher ist, als man sie nach der Angabe Kühne's erwarten sollte.

Um bezüglich der quantitativen Ausbeuten an «Antipepton» die näheren Aufklärungen zu geben, muss ich kurz die Theorie Kühne's über die Spaltung des Eiweisses durch Trypsin berühren. Danach besteht das Eiweissmolekül aus zwei dem Gewicht nach gleichen Hälften, der Anti- und der Hemigruppe. Gemäss dieser Theorie soll bei der Spaltung des Eiweisses durch Trypsin die Antigruppe als einziges Endprodukt lediglich Antipepton liefern, dieses aber seinem Gewicht nach die Hälfte des zur Verdauung gelangten Eiweisses ausmachen. Die Theorie Kühne's findet einen Abschluss in den Angaben Siegfried's²⁾ und Balke's,³⁾ dass das Antipepton identisch mit der Fleischsäure und mithin eine einbasische Säure von der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ und dem Molekulargewicht 257 ist.

Nach der oben geschilderten Theorie berechnet Kühne⁴⁾ die Ausbeute an Antipepton, welche er in einem quantitativen Versuch erhalten hat, der mit Ausnahme meiner eigenen der einzige ist, welcher zahlenmässig die factisch an «Antipepton» zu erhaltende Ausbeute angibt. In diesem Versuch, welcher sich gerade auf ein Antipepton bezieht, das sowohl von Siegfried⁵⁾ wie von Balke⁶⁾ als besonders reines Präparat citirt und zur Identificirung mit den eigenen Produkten benutzt wird, nämlich auf Antipepton

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 335.

2) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 416.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 255.

4) Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXII, S. 435, 36, 37, Antipepton [C].

5) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 415.

6) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 251.

(C), waren nach Kühne und Chittenden 388 g Albumine zur Verdauung gekommen. Die Ausbeute sollte theoretisch 194 g «Antipepton» betragen. In Wirklichkeit wurden 120 g, also 62% der berechneten Ausbeute gewonnen.

In meiner ersten Untersuchung über Antipepton,¹⁾ in der ich von einem genau nach Kühne und Chittenden dargestellten Präparat ausging, erhielt ich eine Ausbeute, die den obigen Zahlen sehr nahe kommt, ich gewann dort aus 213 g verdauten Albuminen statt der berechneten 106 g «Antipepton» 60 g, also 57% der nach Kühne's Theorie berechneten Menge. Auch bei meinem zweiten, unter Benutzung des Verfahrens von Balke angestellten Versuch blieb die Ausbeute wesentlich hinter der theoretischen zurück und nähert sich der von Kühne. Ich erhielt nämlich aus 526 g verdauten Albuminen statt der theoretischen 263 g ca. 200 g, also 76% der berechneten Ausbeute an «Antipepton». Die Steigerung der Ausbeute in dem letzten Versuch gegenüber dem ersten erklärt sich sehr einfach aus Angaben Balke's²⁾ selbst. Denn nach denselben schränkt die Methode Balke's die Zahl der Operationen der Kühne'schen Methode, die Verluste bei der Darstellung unvermeidlich machen, wesentlich ein. Da ich also in Wirklichkeit mit «Antipeptonpräparaten» gearbeitet habe, welche in ihrer Ausbeute einem nach Siegfried und Balke besonders gelungenen Kühne'schen Präparate entsprachen, kann ich wohl die Einwände Siegfried's gegen mein Ausgangsmaterial als hinfällig ansehen.

Bei oberflächlicher Betrachtung der weiteren Mittheilungen Siegfried's könnte man den Eindruck gewinnen, als ob Siegfried meine Behauptungen, dass das nach Balke's Vorschrift dargestellte Antipepton ein Gemenge sei, widerlegen wolle. In der That kann dies nur dadurch geschehen, dass Siegfried einen einheitlichen Körper von der Formel $C_{10}H_{13}N_3O_5$ mit peptonartigem Charakter nach der Methode Balke's darstellt, und dass er meine Angaben über die Zerlegung des «Anti-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 195.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 252.

peptons Balke» in Histidin, Arginin, Lysin etc. als irrthümlich erweist.

Doch nichts davon geschieht, sondern Siegfried stellt Versuche zur Reindarstellung des «Antipeptons» an, was doch überflüssig sein würde, wenn man in Wirklichkeit durch die Methode Balke's und die alte Eisenmethode Siegfried's zu analysenreinen Präparaten der Formel $C_{10}H_{13}N_3O_5$ kommen könnte.

Was haben nun die neuen Versuche Siegfried's zur Reindarstellung eines Antipeptons geleistet?

Ueber seine Versuche zur Reindarstellung eines Antipeptons von constanter Zusammensetzung durch Reinigung des Rohantipeptons mit Alkohol, die sich zum Theil noch eng an das Verfahren Kühne's und Balke's anlehnen, kann ich hinweggehen, da Siegfried darüber selbst den Stab mit den Worten bricht: «Ich habe die Versuche, durch Alkoholreinigung zu reinen Produkten zu gelangen, aufgegeben».

Ich wende mich nunmehr den Versuchen Siegfried's zur Reindarstellung des Antipeptons durch Fällen seiner Eisenverbindung in ammoniumsulfatgesättigten Lösungen zu.

Hier kommt nur ein Präparat in Betracht, für dessen Reinheit Siegfried keine Garantie übernehmen will und kann. Mit demselben stellt er qualitative Reactionen an und publicirt dieselben auch noch, doch wahrscheinlich, um damit die Reactionen für das reine hypothetische «Antipepton» festzulegen. Unter diesen qualitativen Reactionen ist mir namentlich Nr. 8 aufgefallen, wegen der wesentlichen Einschränkung, die die Angaben von Kühne¹⁾ und Chittenden,¹⁾ Balke²⁾ und Siegfried³⁾ selbst dadurch erfahren. Denn nach derselben soll das Antipepton nur in concentrirten Lösungen durch Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure fällbar sein, während bisher alle Autoren — trotzdem es bekannt ist, dass die Phosphorwolframsäure das Antipepton nicht vollständig niederschlägt — doch die

¹⁾ Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXII, S. 450.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 255.

³⁾ Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., 1894, S. 414.

Phosphorwolframsäure als ein wesentliches Fällungsmittel betrachten, auf das Kühne und Chittenden sogar ihre «Reinigungsmethode» des Antipeptons gründeten. Ich möchte auf diese von Siegfried erst jetzt, nachdem sich die Phosphorwolframsäure als ein brauchbares Reagens zur Auftheilung des Antipeptons erwiesen hat, so stark beschränkte Fällbarkeit des Antipeptons durch Phosphorwolframsäure aufmerksam machen.

Durch seine weiteren Versuche bestätigt dann Siegfried meine Einwände gegen die Brauchbarkeit seiner alten Methode zur Isolirung des Antipeptons durch die Eisenfällung, da er feststellen muss, dass seine Methode nicht specifisch ist, sondern dass auch andere Körper durch das Eisen niedergeschlagen werden. Das Resultat Siegfried's, durch die Eisenfällung zu einem einheitlichen «Antipepton» der Formel $C_{10}H_{13}N_5O_3$ zu gelangen, gipfelt schliesslich in folgenden zwei Sätzen: «Die Analysen der Silbersalze (des Antipeptons¹⁾, der aus diesen dargestellten Säuren und Zinksalze lieferten zwar in einigen Fällen Werthe, welche mit denen für Fleischsäure und ihre Salze berechneten nahe übereinstimmten. Dieselben besitzen aber vorläufig keine Beweiskraft,²⁾ da bei Parallelversuchen mit anderen Rohantipeptonpräparaten andere Resultate erhalten wurden.»

Danach ist es also Siegfried nicht gelungen, mittelst seiner neuen Methoden sicher zu einem einheitlichen Antipepton zu kommen, und von ihm auch nicht ein stichhaltiger Beweis gegen meine Behauptung, dass sowohl nach der Methode Balke's, wie nach seiner alten Methode dargestelltes Antipepton ein Gemenge heterogener Körper sein muss, erbracht worden.

Auch den Schlussatz der Siegfried'schen Arbeit, «dass bei der tryptischen Verdauung aus dem Eiweiss ein Antipepton entsteht, welches durch Ammonsulfat nicht aussalzbar

1) Die beiden eingeklammerten Worte sind von mir des Verständnisses halber eingefügt.

2) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

ist, eine starke Biuretreaction, nicht die Millon'sche gibt und schwefelfrei ist,» muss ich nach Versuchen, die ich anderweitig¹⁾ veröffentlicht habe, durchaus bestreiten.

Ein wesentliches Kennzeichen des Antipeptons ist bekanntlich, nach Kühne, seine absolute Widerstandsfähigkeit gegen jede weitere Einwirkung des Trypsins. Ich habe aber in der citirten Arbeit zeigen können, dass, wenn man dem Trypsin nicht eine übermässige Arbeitsleistung zumuthet, die biuretgebende Substanz bis auf Spuren vernichtet wird, die Theorie Kühne's von einem Antipepton, das seinem Gewicht nach die Hälfte des in Verdauung gegebenen Eiweisses ausmachen, und das nach Siegfried eine einbasische Säure der Formel $C_{10}H_{15}N_3O_5$ sein soll, also nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

Auf Grund der citirten Versuche und der im Laufe derselben ausgeführten quantitativen Bestimmungen kam ich zu folgenden, mit den Angaben Siegfried's unverträglichen Schlussätzen:

Durch eine energische langdauernde Trypsinverdauung lässt sich eine Reihe Eiweisskörper sicher bis auf Spuren spalten.

Die Spaltung verläuft wahrscheinlich durchaus ähnlich der durch starke Schwefelsäure bewirkten.

Als Endprodukte treten schliesslich dieselben Körper auf, die wir auch bei der Spaltung des Eiweisses durch starke Schwefelsäure erscheinen sehen, während die Peptone nur Zwischenstufen bilden.²⁾

Aus dem letzten Satz ergibt sich, glaube ich, zur Genüge, dass ich das Auftreten von Durchgangsprodukten peptonartigen

1) Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Habilitationsschrift, erschienen im Verlag von Karl J. Trübner, Strassburg.

2) In meiner Habilitationsschrift habe ich an einzelnen Stellen den Ausdruck concentrirte Schwefelsäure gebraucht. Trotzdem aus dem Zusammenhang klar ist, dass ich eine Schwefelsäure der Concentration, wie sie von Ritthausen bei der Spaltung der Eiweisskörper angewandt worden ist, im Sinne hatte, erkläre ich dies noch ausdrücklich, um Irrthümer auszuschliessen.

Charakters bei der tryptischen Verdauung nicht bestreite, dagegen muss ich die Versuche, solche Durchgangsprodukte jetzt als Antipepton in die chemisch-physiologische Litteratur einzuführen, als durchaus unzulässig zurückweisen, weil dieselben der Theorie Kühne's, nach der das «Antipepton» das einzige Endprodukt der tryptischen Verdauung der «Antigruppe» ist, direkt entgegenlaufen und nur dazu dienen, den wahren Thatbestand zu verdunkeln.

Auf meine letzte Arbeit hat Siegfried keine Rücksicht genommen und das Gegentheil der von mir darin erarbeiteten Resultate nicht erwiesen.

Weitere Beiträge zur Kenntniss der Fibrinbildung.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaction zugegangen am 30. Juni 1899.)

In einer früheren Arbeit¹⁾ habe ich die Beziehung der löslichen Kalksalze zu der Fibrinbildung einer experimentellen Prüfung unterworfen, und ich konnte dabei zeigen, dass die durch Oxalat fällbaren Kalksalze für die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin durch das Fibrinferment ohne Bedeutung sind. Ich konnte ferner auch zeigen, dass für die Annahme einer Kalkaufnahme des Fibrinogens bei der Fibrinbildung keine genügenden Gründe vorgebracht worden sind. Bei Bestimmung des Kalkgehaltes in dem Fibrinogen und dem Fibrin fand ich auch in beiden Fällen etwa die nämliche Menge, oder rund etwa 0,050%.

Wenn schon diese Bestimmungen gegen die Theorie einer Kalkaufnahme entschieden sprachen, so schien es mir jedoch nothwendig zu sein, noch weitere Untersuchungen über denselben Gegenstand auszuführen, um, wenn möglich, ein noch kalkärmeres oder sogar ein kalkfreies Fibrinogen, bezw. Fibrin, zu gewinnen. Ursprünglich hatte ich hierbei die Absicht, Fibrinogen und Fibrin aus derselben Lösung mit einander bezüglich des Kalkgehaltes zu vergleichen; da es aber im Laufe meiner Untersuchungen sich zeigte, dass man den Kalkgehalt des Fibrins auf ein solches Minimum herabbringen kann, dass derartige, mühsame und grosse Mengen von Fibrinogenlösung erfordernde vergleichende Bestimmungen überflüssig sind, stand ich von diesem Plane ab. Ich begnügte mich also damit, den

¹⁾ Olof Hammarsten, Ueber die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 333.

Kalkgehalt des aus möglichst kalkarmen Fibrinogen- und Fibrinfermentlösungen dargestellten Fibrins zu bestimmen.

Wenn ich eben von möglichst kalkarmen Fibrinogen- und Fibrinfermentlösungen gesprochen habe, so liegt schon hierin eine Andeutung davon, dass ich noch nie absolut kalkfreie Lösungen, sei es von Fibrinogen oder Fibrinferment, habe darstellen können. Der Grund hierzu dürfte wohl auch darin gelegen sein, dass die löslichen Eiweissstoffe überhaupt, das Fibrinogen mit eingerechnet, die Fähigkeit haben, sehr kleine Mengen von in Wasser unlöslichen Kalksalzen in Lösung zu halten. Wenn man nun bei der Darstellung des Fibrinogens diesen Stoff mit Chlornatrium oder einer Säure aus seiner Lösung fällt, so wird wenigstens ein Theil des von ihm gelösten Kalksalzes (des Calciumoxalates) mit niedergerissen, und beim Wiederauflösen des Fibrinogens wird es wieder gelöst. Diese Spuren von Kalksalzen dürften also wahrscheinlich erst durch ein mehrmals wiederholtes Ausfällen zu entfernen sein; da aber ein zu oft gefälltes Fibrinogen leicht ein nicht ganz typisches Fibrin liefert, und da ich aus dem Grunde das Fibrinogen nur 3 bis höchstens 4 Mal gefällt habe, konnte ich auch nie ein absolut kalkfreies Fibrinogen gewinnen. Sowohl für das Fibrinogen wie für das Fibrin habe ich aber, wie oben angedeutet, den Kalkgehalt auf ein solches Minimum erniedrigen können, dass er mit Rücksicht auf die Fibrinbildung ganz ohne Belang ist.

Die zu der Fibrindarstellung benutzten Ferment- und Fibrinogenlösungen stellte ich in folgender Weise dar:

Zur Darstellung der Fermentlösungen benutzte ich immer Rinderblutserum, welches mit 0,3% Kaliumoxalat versetzt worden war. Nach 24 Stunden wurde anhaltend und kräftig, wenn nöthig mehrmals, centrifugirt, bis ein ganz klares, von festen, aufgeschlemmten Partikelchen vollständig freies Serum erhalten wurde. Dieses Serum, welches überschüssiges Alkali-oxalat enthielt, wurde mit gegen 15 Volumina Alkohol gefällt und 8 Monate stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde durch Leinwand abfiltrirt; der Niederschlag wurde stark gepresst, fein zerrieben und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

Das trockene Pulver enthielt immer etwas Alkalioxalat, welches von dem Alkohol ausgefällt worden war und welches bei gewissen Versuchsanordnungen (wie bei Zusatz von Kalksalzen) störend wirken kann. Aus dem Grunde zerrieb ich bei der Darstellung meiner Fermentlösungen das Pulver rasch mit Wasser und wusch es mit wenig Wasser, durch Decantation mit Hilfe von einer kleinen Handcentrifuge, möglichst rasch aus, bis das Waschwasser keine Reaction auf Oxalat mit Kalksalz mehr gab. Dann liess ich das ausgewaschene Pulver mit Wasser (100 ccm. auf je 1 g) 24—48 Stunden unter mehrmaligem Umschütteln in der Kälte stehen und filtrirte zuletzt durch ein aschefreies Filtrum.

Die so gewonnenen Fermentlösungen waren kräftig wirksam, trotzdem sie nur wenig Substanz enthielten. Die Menge der festen Stoffe war 0,3—0,4 ‰. Den Gehalt an Kalk bestimmte ich durch Eintrocknen (von 500 ccm.), Einäschern, Ausfällung als Oxalat und Titration mit N/100 Kaliumpermanganatlösung, von der also je 1 ccm. 0,28 mg CaO entsprach. Der Gehalt an Kalk im Liter der Fermentlösung war 0,4 bis 0,7 mg, d. h. 0,0004—0,0007 ‰.

Bei der Darstellung der Fibrinogenlösungen verfuhr ich hauptsächlich, wie in dem oben citirten Aufsatze angegeben worden ist. Das Oxalatplasma (0,3 ‰ Oxalat) wurde erst möglichst vollständig centrifugirt und darauf, erst nachdem es über eine Nacht in der Winterkälte gestanden hatte, filtrirt. Es scheidet sich nämlich hierbei regelmässig eine Fällung aus (vergl. S. 344 und 345 der citirten Abhandlung), die ich stets abfiltrirte. Das hiervon getrennte Filtrat wurde mit einer unzureichenden Menge NaCl-Lösung gefällt, um etwa noch vorhandene aufgeschlemmte, feste Partikelchen mit dem hierbei sich ausscheidenden Fibrinogen entfernen zu können. Das hiervon erhaltene, neue, vollständig klare Filtrat wurde dann mit gesättigter NaCl-Lösung gefällt.

In einigen Fällen dialysirte ich das 3 Mal gefällte Fibrinogen gegen Wasser, welches 0,003 ‰ NaOH enthielt, schlug das Fibrinogen aus der dialysirten Lösung mit Essigsäure nieder und löste es wieder in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig

Alkali. Da aber das Fibrinogen hierdurch zuweilen derart verändert wird, dass es keinen ganz typischen Faserstoff liefert, stand ich bald von dieser, übrigens mit recht grossen Verlusten an Substanz verknüpften Methode ab und blieb, bei einem 4maligen Ausfällen mit NaCl stehen.

Um hierbei brauchbare Resultate zu bekommen, muss man immer mit kalkfreiem Filtrirpapier und kalkfreiem NaCl arbeiten. Mit Rücksicht auf das Filtrirpapier bemerke ich, dass ich bei der 3. und 4. Ausfällung, wie auch bei der Filtration der fertigen Fibrinogenlösungen, immer aschefreie Filtra von Schleicher und Schüll benutzt habe. Bei der Filtration des Oxalatplasmas, zu welcher viel grössere Filtra erforderlich waren, wie auch bei den zwei ersten Ausfällungen mit NaCl, habe ich ein Filtrirpapier benutzt, das ich selbst durch anhaltendes Auswaschen von löslichem Kalksalz vollständig befreit hatte. Auch bei dem Auspressen der Filter mit den Fibrinogenfällungen zwischen Fliesspapier musste ich entkalkten Papieres mich bedienen. Die zu den zwei ersten Ausfällungen benutzte gesättigte NaCl-Lösung war durch Zusatz von überschüssigem Kaliumoxalat so weit möglich von Kalk befreit worden. Zu der 3. und 4. Ausfällung benutzte ich stets chemisch reines NaCl, das ich theils selbst bereitet, theils aber von Merck bezogen hatte, und dessen Reinheit ich stets besonders prüfte. In Folge aller dieser Vorsichtsmassregeln und vorbereitenden Arbeiten sind diese meine Untersuchungen sehr mühsam und zeitraubend und auch recht kostspielig geworden, um so mehr, als in einigen Fällen das Fibrinogen in Folge der chemischen Proceduren etwas verändert worden war, so dass es keinen ganz typischen Faserstoff lieferte und die ganze Arbeit also umsonst war. Ich bemerke nämlich, dass ich nur solche Versuche als brauchbar angesehen habe, in welchen die Fibrinbildung ganz typisch von Statten ging und das Fibrin eine ganz typische Beschaffenheit hatte.

Zu der Fibrinogenlösung wurde das gleiche Volumen der Fermentlösung gesetzt, und das Fibrin wurde, besonders in den ersten Stunden, in dem Masse, als es gebildet wurde, um den Glasstab herumgedreht, zusammengepresst und heraus-

genommen, weil sonst die ganze Flüssigkeit binnen Kurzem zu einem sehr festen Gerinnsel geseht. Das Fibrin wurde mit einer Scheere fein zerschnitten, erst mit NaCl-Lösung von 10%, darauf mit Wasser ausgewaschen und endlich mit Alkohol behandelt. Die Asche wurde in Salzsäure gelöst, der Kalk nach bekannten Regeln als Oxalat gefällt und durch Titration mit einer $\frac{N}{100}$ Kaliumpermanganatlösung bestimmt.

Wie oben bemerkt, habe ich das Fibrinogen nie ganz frei von Kalk erhalten. Als Minimum habe ich in demselben 0,006% CaO gefunden. In dem Fibrin fand ich als Minimum 0,00705% CaO.

Als Belege führe ich die zwei Bestimmungen an, welche für das Fibrin den niedrigsten Kalkgehalt ergeben haben. Diese zwei Fibrine, die beide ganz typisch waren, stammten von durch 4maliges Ausfällen gereinigtem Fibrinogen her.

a) 6,335 g Fibrin. Die Oxalatfällung erforderte 1,6 ccm. $\frac{N}{100}$ Kaliumpermanganatlösung = 0,448 mg CaO = 0,00707%.

b) 5,008 g Fibrin. Die Oxalatfällung erforderte 1,7 ccm. $\frac{N}{100}$ Kaliumpermanganatlösung = 0,476 mg CaO = 0,009505%.

Als Mittel aus diesen beiden Bestimmungen ergibt sich also der Werth 0,008278% CaO.

Da man früher in dem Fibrin mehr als 0,1% CaO gefunden hat und da der Kalkgehalt nunmehr bis auf 0,007% herabgesetzt worden ist, liegt hierin ein weiterer Beweis für die allgemein bekannte Neigung des Fibrins, bei seiner Entstehung in einer Lösung Kalkverbindungen mit niederzureissen. Wenn man in 5—6 g Fibrin nur gegen 0,5 mg CaO findet, kann dies auch nach meiner Ansicht nur als eine kaum zu vermeidende Verunreinigung betrachtet werden, und diese Befunde dürften also zeigen, dass das Fibrin keine Kalkverbindung des Fibrinogens ist. Wenn man annehmen wollte, dass die obigen 0,007% CaO = 0,005% Ca keine Verunreinigung repräsentiren, sondern dem Fibrinmoleküle selbst angehören, würde nämlich das Molekulargewicht des Fibrins etwas mehr als 800000 betragen und also reichlich 50mal so gross wie das des Oxyhämoglobins sein. Diejenigen Theorien, nach welchen das Fibrin eine Kalkverbindung des Fibrinogens sei, bezw. bei der Fibrinbildung eine Kalkauf-

nahme stattfinden soll, muss ich also nach diesen Untersuchungen als widerlegt betrachten.

Mit dieser Behauptung befindet sich die von Arthus zuerst gemachte und dann von Anderen bestätigte Beobachtung, dass die löslichen Kalksalze ein nothwendiges Bedingniss für die Gerinnung des Blutes oder Plasmas sind, in keinem Widerspruch. Es ist nämlich sehr wohl möglich, dass die Kalksalze, in Uebereinstimmung mit der Ansicht Pekelharing's, gerade für die Entstehung des Fibrinfermentes von Bedeutung sind. Die löslichen Kalksalze wirken übrigens, wie ich zuerst für die Transsudate nachgewiesen habe, auf die Gerinnung der Transsudate und des Plasmas derart ein, dass sie theils die Gerinnung beschleunigen und theils die Menge des ausgeschiedenen Faserstoffes vermehren. Da man aber bei Gerinnungsversuchen mit Plasma oder Transsudaten mit Gemengen von complicirter, zum Theil unbekannter Zusammensetzung arbeitet, schien es mir nicht ohne Interesse zu sein, die Wirkung der Kalksalze auf die Geschwindigkeit der Gerinnung wie auf die Menge des Faserstoffes in Gemengen von möglichst reinen Fibrinogen- und Fibrinfermentlösungen zu untersuchen.

Zu dem Ende habe ich die folgenden tabellarisch zusammengestellten Versuche ausgeführt. Die Ferment- und die Fibrinogenlösungen waren, wie oben angegeben, bereitet und das Fibrinogen war durch mindestens zweimaliges Ausfällen mit chemisch reinem NaCl frei von Kaliumoxalat erhalten. Die Menge des Fibrinogens in der Lösung wurde durch Eintrocknen einer abgemessenen Menge derselben, Trocknen bei etwa 105° C. bis zum constanten Gewicht, Einäschern, Bestimmung des NaCl durch Titration mit AgNO_3 , $\text{N}/_{10}$, und Berechnung des Fibrinogens als Differenz bestimmt. Das ausgeschiedene Fibrin wurde erst mit verdünnter NaCl-Lösung und darauf mit Wasser gewaschen, in kleinen Kästchen aus Platinblech bis zu constantem Gewicht getrocknet, gewogen und eingeäschert. Die Asche war jedoch meistens nicht genau wägbar. In jedem Versuche wurden 15—20 ccm. Fibrinogenlösung verwendet, wodurch eine für genaue Wägungen völlig hinreichende Menge Fibrin — als Minimum 140, meistens

aber 200 mg und darüber — erhalten wurde. In jedem Versuche wurden drei verschiedene Proben angeordnet, von denen die eine frei von CaCl_2 war, die zwei anderen dagegen wechselnde Mengen davon enthielten. Es wurden hierbei durch entsprechenden Wasserzusatz alle drei Proben auf dasselbe Volumen gebracht, so dass sie, nach Zusatz von derselben Menge Fermentlösung, mit Ausnahme von dem verschiedenen CaCl_2 -Gehalte, alle ganz gleich waren. Das Volumen der fertigen Versuchsflüssigkeit schwankte in den verschiedenen Versuchen zwischen etwa 40—50 ccm.

Das Fibrin musste, vor Allem in den ersten Stunden, in dem Masse, wie es sich neu bildete, wiederholt herausgenommen werden, weil sonst die ganze Flüssigkeit zu einer sehr festen, nicht weiter zu verarbeitenden Masse erstarrte. Durch Herumwinden um den Glasstab und Auspressen gegen die Wand des Becherglases gelang es, wenn auch nicht ohne Schwierigkeit, das Fibrin ohne nennenswerthe Verluste an Versuchsflüssigkeit herauszunehmen. Innerhalb der ersten 8—12 Stunden war regelmässig die Fibrinbildung fast vollständig abgeschlossen und es kamen dann in den nächsten 12—24 Stunden nur sehr spärliche Fibrinausscheidungen vor. Wenn im Laufe von 12 Stunden kein Faserstoff mehr sich ausschied, wurde die Fibrinbildung als beendet angesehen und der Versuch unterbrochen.

Bezüglich der Gerinnungsgeschwindigkeit zeigten sämtliche Versuche, dass das CaCl_2 in Mengen von 0,05—0,200% dieselbe beschleunigt, während durch eine Menge von 0,625% das Auftreten der Gerinnung dagegen um mehr als drei Stunden verzögert wurde. Die beschleunigende Wirkung der obigen kleinen CaCl_2 -Mengen war indessen keine bedeutende. Die Gerinnung trat in den CaCl_2 -freien Proben regelmässig nur um 10—15 Minuten später als in den CaCl_2 -haltigen auf, und zwischen den Proben (b und c) mit der kleinen und der doppelten CaCl_2 -Menge war kein nennenswerther Unterschied zu sehen. Die beschleunigende Einwirkung des CaCl_2 gab sich aber besonders dadurch kund, dass die Fibrinbildung bei Gegenwart von dem Kalksalze auf eine kürzere Zeit zusammengedrängt wurde, so dass die Hauptmasse des Faserstoffes

hierbei z. B. in 6—8 Stunden sich ausgeschieden hatte, während dies bei Abwesenheit von CaCl_2 erst nach etwa 10—12 Stunden geschehen war. Auch in dieser Hinsicht war aber der Unterschied zwischen den ungleichen CaCl_2 -Mengen nur gering.

Wie in den Transsudaten, so übt also das CaCl_2 auch in Lösungen von reinem Fibrinogen und Ferment eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung aus. Dagegen ist seine Einwirkung auf die Menge des gebildeten Faserstoffes, wie die folgende tabellarische Zusammenstellung zeigt, eine kaum merkbare oder jedenfalls nur eine sehr geringfügige. In dieser Zusammenstellung sind sämtliche Werthe mit Ausnahme von denjenigen in der Colonne 5, auf 100 Volumtheile der Versuchsflüssigkeit (d. h. also des Gemenges von Fibrinogen- und Fermentlösung sammt CaCl_2 -Lösung, bezw. Wasser) berechnet. In der Colonne 5 findet man die Menge des Fibrins in Procenten von dem Fibrinogen berechnet.

	Fibrinogen in Proc.	NaCl in Proc.	CaCl_2 in Proc.	Fibrin in Proc.	Fibrin in Proc. von dem Fibrinogen
Versuch 1	a) 0,500	0,87	0,000	0,394	78,80
	b) 0,500	0,87	0,091	0,391	78,20
	c) 0,500	0,87	0,182	0,395	79,00
Versuch 2	a) 0,7209	0,836	0,000	0,459	63,67
	b) 0,7209	0,836	0,091	0,466	64,50
	c) 0,7209	0,836	0,182	0,461	63,95
Versuch 3	a) 0,513	0,788	0,000	0,4193	81,73
	b) 0,513	0,788	0,070	0,4227	82,39
	c) 0,513	0,788	0,140	0,424	82,64
Versuch 4	a) 0,691	0,986	0,000	0,513	72,24
	b) 0,691	0,986	0,091	0,525	75,98
	c) 0,691	0,986	0,182	0,526	76,12
Versuch 5	a) 0,623	0,600	0,000	0,4855	77,93
	b) 0,623	0,600	0,200	0,4850	77,85
	c) 0,623	0,600	0,625	0,443	71,11
Versuch 6	a) 0,500	1,05	0,000	0,374	74,80
	b) 0,500	1,05	0,054	0,389	77,80
	c) 0,500	1,05	0,108	0,390	78,00

Wie man aus dieser Zusammenstellung ersieht, findet sich in einigen Versuchen kein sicherer Unterschied der Fibrinmengen in den CaCl_2 -freien und den CaCl_2 -haltigen Proben; und selbst in dem Versuche 6, wo das Optimum der Kochsalzmenge überschritten und die schädliche Wirkung des NaCl zu überwinden war, ist er nur gering. Ebenso wenig findet man einen regelmässigen Unterschied zu Gunsten des etwas höheren CaCl_2 -gehaltes, und im Grossen und Ganzen ist die Fibrinmenge in beiden Fällen (bei niedrigerem oder höherem Kalkgehalt) dieselbe. Eine Ausnahme bildet nur der Versuch 5, wo der hohe Gehalt an CaCl_2 nicht nur, wie oben bemerkt, stark gerinnungshemmend wirkte, sondern auch die Menge des Faserstoffes bedeutend herabsetzte. Es zeigt dies, dass das CaCl_2 ebenso wie das NaCl und andere Neutralsalze in etwas grösserer Menge störend auf die Fibrinbildung einwirkt.

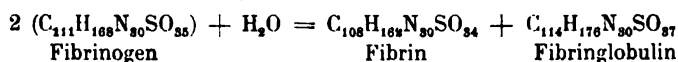
Zu den oben mitgetheilten Versuchen habe ich sonst nur die Bemerkung zu machen, dass in dem Versuche 2, wo die (procentisch berechnet) kleinste Menge Faserstoff erhalten wurde, der Faserstoff nicht ganz typisch war. Er war nämlich in verdünnter Chlorwasserstoffsäure bei Zimmertemperatur nicht so schwerlöslich, wie gewöhnlicher Faserstoff und er löste sich auch nach ein paar Tagen in Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur auf.

In reinen Lösungen von Fibrinogen und kräftig wirkendem Fibrinferment übt also das CaCl_2 keine constante und überhaupt keine wesentlich vermehrende Einwirkung auf die Menge des Fibrins aus, und hierin besteht also ein weiterer, seiner Ursache nach noch unbekannter Unterschied in der Einwirkung der löslichen Kalksalze auf die reinen Fibrinogenlösungen einerseits und das Plasma, bezw. die Transsudate andererseits.

In seinem Aufsätze «Ueber die Elementarformeln einiger Eiweisskörper» etc. hat Schmiedeberg¹⁾ die Grundformeln der bei der Fibrinbildung in Betracht kommenden Eiweisskörper anzugeben versucht, und er glaubt den chemischen

1) Archiv für experiment. Pathol. u. Pharmac. Bd. XXXIX.

Vorgang bei der Fibrinogengerinnung durch die folgende Gleichung ausdrücken zu können;



Nach dieser Formelgleichung würden aus dem Fibrinogen nur 48—49 % Fibrin entstehen können, während ich in früheren Arbeiten bei der direkten Bestimmung 61—94 % des angewendeten Fibrinogens wiederfand. Um über diesen Widerspruch hinauskommen zu können, erinnert Schmiedeberg daran, dass ich den Gehalt meiner Lösungen an Fibrinogen durch Fällung mit Magnesiumsulfat nach der bei Globulinbestimmungen üblichen Methode bestimmt habe, und er setzt in Frage, ob nicht bei diesen Bestimmungen vielleicht ein Theil des Fibrinogens dem Nachweis sich entzogen habe, so dass die Lösungen weit mehr Fibrinogen enthielten, als die Bestimmungen ergaben.

Eine solche Vermuthung muss etwas befremdend erscheinen, da es allgemein bekannt sein dürfte, dass das Fibrinogen viel leichter als die meisten anderen Globuline durch Salze, auch Magnesiumsulfat, vollständig gefällt wird. Da ferner diese Methode der quantitativen Globulinbestimmung von mir herrührt, da ich sie ausgearbeitet und nach verschiedenen Richtungen geprüft habe, dürfte wohl hierin auch eine gewisse Garantie dafür liegen können, dass ich des von Schmiedeberg vermutheten groben Bestimmungsfehlers mich nicht schuldig gemacht habe.

Der einzig sichere Weg, um solche Vermuthungen zu beweisen, bezw. zu widerlegen, liegt indessen nur in neuen, möglichst sorgfältigen Untersuchungen; und von diesem Gesichtspunkte aus dürften die oben tabellarisch zusammengestellten Versuche mit reinen Fibrinogenlösungen nicht ohne Interesse sein. In diesen Versuchen ist eine solche Vermuthung völlig ausgeschlossen. Das Fibrinogen wurde nämlich durch Eintrocknen einer abgemessenen Menge der Lösung, Wägung des Rückstandes, Einäschern desselben und Bestimmung des NaCl durch Titration mit $\frac{N}{10}$ AgNO₃ bestimmt. Das Fibrinogen wurde also in diesen Fällen als Differenz zwischen dem NaCl

und den übrigen festen Stoffen berechnet. Alles, was in einer solchen Lösung von festen Stoffen (mit Ausnahme des NaCl) vorhanden war, also alle etwa als Verunreinigungen anwesenden Stoffe, sind hier als Fibrinogen berechnet worden; und wenn man annehmen will, dass ich durch ungeschickte Arbeit bei dem Einäschern oder dem Auslaugen der Kohle etwas NaCl verloren habe, so muss die berechnete Fibrinogenmenge hierdurch entsprechend vermehrt werden. Die Zahlen für das Fibrinogen sind also Maximalzahlen und sie können unter keinen Umständen als zu niedrig betrachtet werden. Die für das Fibrin gefundenen Werthe, in Procenten von dem Fibrinogen berechnet, können also zwar zu niedrig, aber unter keinen Umständen zu hoch sein.

Kehren wir nun zu der tabellarischen Zusammenstellung zurück, so finden wir, wenn wir vorläufig von dem Versuche 2, in welchem das Fibrin nicht ganz typisch war, absehen, dass die Menge des Fibrins, in Procenten von dem Fibrinogen, bei Abwesenheit von CaCl_2 72,24—81,73 und bei Gegenwart von solchem 75,98—82,6 betrug. Diese Zahlen weichen, wie die nach anderer Methode von mir früher erhaltenen, so weit von den von Schmiedeberg berechneten 48—49 % Fibrin ab, dass für mich kein Zweifel darüber bestehen kann, dass die Fibrinbildung nicht nach dem von Schmiedeberg berechneten Schema verläuft. Wenn Schmiedeberg zuletzt sagt: «Jedenfalls kann jener Befund» (d. h. meine früheren Zahlen) «die Resultate der Berechnungen nicht widerlegen», so kann ich ihm hierin leider nicht beistimmen. Dass bei der Fibrinbildung statt nur 48—49 % sogar über 80 % Fibrin aus dem Fibrinogen entstehen können, betrachte ich nämlich als eine sichergestellte Thatsache, und ich muss den Thatsachen eine grössere Beweiskraft als den für Umsetzungen der Eiweissstoffe berechneten Formelgleichungen zumessen.

In meinen früheren Arbeiten über die Fibrinbildung¹⁾ habe ich bewiesen, dass bei der Gerinnung zwei neue Stoffe,

¹⁾ Vergl. insbesondere: Ueber den Faserstoff und seine Entstehung aus dem Fibrinogen. Pflüger's Archiv, Bd. XXX.

das Fibrin und ein lösliches Globulin, das Fibringlobulin, aus dem Fibrinogen entstehen; aber ich habe auch wiederholt hervorgehoben, dass hierdurch eine hydrolytische Spaltung des Fibrinogens noch nicht bewiesen ist.

Es ist nämlich sehr wohl möglich, dass das Fibringlobulin kein bei der Gerinnung entstandenes Spaltungsprodukt des Fibrinogens, sondern vielmehr nur ein in Lösung gebliebener, allmählich umgewandelter Rest des bei der Gerinnung entstandenen Fibrins sei. Diese Möglichkeit glaubt Schmiedeberg auf Grund der verschiedenen Zusammensetzung der drei fraglichen Eiweissstoffe und der aus ihr berechneten Formeln zurückweisen zu können; aber trotzdem muss ich, aus den unten anzuführenden Gründen, fortwährend an meiner Meinung festhalten.

Bevor ich zu diesen Gründen übergehe, muss ich jedoch erst dem Fibringlobulin einige Worte widmen.

In einer im vorigen Jahre erschienenen Inauguraldissertation hat Reye¹⁾ eine Methode zur Ausfällung des Fibrinogens durch fractionirte Fällung des Plasmas mit Ammoniumsulfat angegeben. Mit derselben Methode hat er auch das Blutserum geprüft, und er konnte darin auch einen geringen Niederschlag erzeugen. Diesen Niederschlag hat er nicht näher untersucht, glaubt ihn aber, bis fortgesetzte Untersuchungen etwas anderes erwiesen haben, als Fibrinogen bezeichnen zu können, und er findet hierin eine genügende Veranlassung, die Richtigkeit meiner Untersuchungen über das Fibringlobulin in Zweifel zu ziehen. Ein solches Vorgehen scheint mir etwas eigenthümlich zu sein. Ich hatte gezeigt, dass im Serum ein Eiweisskörper vorkommt, welcher zum Unterschied von dem Fibrinogen bei $+64 - 66^{\circ}\text{C.}$ gerinnt, mit Fibrinferment keinen Faserstoff liefert, bezüglich der Fällbarkeit durch Neutralsalz (NaCl) aber fast wie das Fibrinogen sich verhält. Wenn man dies alles erwägt, und wenn man also zu erwarten hat, dass das Fibringlobulin wahrscheinlich auch zu Ammoniumsulfat ungefähr wie das Fibrinogen sich

¹⁾ W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Strassburg 1898.

verhalten soll, so wäre es nach meiner Ansicht in allen Hinsichten richtiger gewesen, statt die Arbeiten eines andern Forschers verdächtig zu machen, die Natur des mit Ammoniumsulfat im Serum erzeugten Niederschlages etwas näher zu untersuchen. Eine solche Untersuchung des genau nach Reye gewonnenen Niederschlages habe ich gemacht und ich habe dabei gefunden, dass dieser Niederschlag (aus dem Pferdeblutserum) allerdings ein Gemenge von verschiedenem Eiweissstoffen (wie von der löslichen Zwischenstufe zwischen Fibrinogen und Fibrin, bisweilen auch von fast unveränderten Fibrinogen) sein kann, dass er aber regelmässig Fibringlobulin enthält. Ich habe diesen Stoff noch in keinem Falle in dem Niederschlage vermisst, wenn auch hier, wie immer, seine Reindarstellung nicht ganz ohne Schwierigkeit ist. Ich habe auch seine Gerinnungstemperatur geprüft und dieselbe regelmässig etwa bei 66—68°C., wie bei der Darstellung dieses Stoffes nach der früher von mir beschriebenen Kochsalzmethode gefunden. Dieser Stoff kann also kein Fibrinogen sein, und diese Versuche liefern also einen neuen Beweis dafür, dass in dem Pferdeblutserum thatsächlich Fibringlobulin enthalten ist.

Ich kann also nunmehr zu den Thatsachen übergehen, welche der Möglichkeit einer Entstehung des Fibringlobulins aus in Lösung gebliebenem Fibrin das Wort reden. Diese Thatsachen sind folgende:

1. Wenn das Fibringlobulin und das Fibrin durch eine Spaltung des Fibrinogens entstanden, und wenn hierbei kein je nach der verschiedenen Beschaffenheit der Versuchsflüssigkeit wechselnder Theil des Fibrins in Lösung bliebe, könnte man erwarten, dass das relative Mengenverhältniss der beiden Spaltungsprodukte wenigstens ein annähernd constantes sein sollte. Dem ist aber nicht so, denn die Menge des Fibrins beträgt zwischen 60 und 94% des Fibrinogens. Diese wechselnde Relation erklärt sich am einfachsten durch die unter 2 begründete Annahme, dass ein wechselnder Theil des Fibrins in Lösung bleiben kann.

2. Durch Aenderung der Relation von Fibrinogen, NaCl, Alkali und Fermentlösung zu einander kann man nämlich die

Menge des ausgeschiedenen Fibrins in Procenten von dem Fibrinogen derart ändern, dass, wie ich beispielsweise in einem früher veröffentlichten Versuche¹⁾ gezeigt habe, ich aus einer und derselben Fibrinogenlösung das eine Mal 81 und das andere Mal 63,6% des Fibrinogens als Fibrin erhielt. In einem fibrinogen-armen Transsudate kann man bisweilen durch Neutralisation des Alkalis die Faserstoffmenge mehr als verdoppeln und in einzelnen Fällen kommt eine Gerinnung überhaupt erst nach der Neutralisation zu Stande, weil sonst alles Fibrin in Lösung bleibt. Das Fibrinogen ist ferner, wie ich wiederholt gezeigt habe, eine ziemlich leicht veränderliche Substanz, und dementsprechend erhält man bisweilen, sei es in Folge einer ursprünglich abweichenden Beschaffenheit des Fibrinogens oder in Folge der Darstellungsmethode, ein nicht ganz typisches Fibrinogen, welches ein in Neutralsalz weniger schwerlösliches Fibrin als sonst gibt. Nun ist es aber insbesondere in solchen Fällen — wie in dem obigen Versuche 2 der Tabelle S. 113 — wo man die kleinsten Zahlen für das Fibrin erhält.

3. Eine wechselnde Menge des Fibrins kann also bei der Fibrinbildung in Lösung bleiben, und es fragt sich also, ob irgend ein Grund für die Annahme vorliegt, dass hierbei aus dem in Lösung gebliebenen Fibrin das Fibringlobulin entstehen könne. In dieser Hinsicht will ich daran erinnern, dass Denis²⁾ unter Beobachtung von besonderen Cautelen aus dem venösen Blute vom Menschen einen Faserstoff (*fibrine concrète pure*) erhielt, welcher in Kochsalzlösung viel leichter als gewöhnliches Fibrin löslich war und welcher dabei in ein, wie das Fibringlobulin bei $+ 65^{\circ}\text{C}$ (die Gerinnung fängt schon bei $+ 60^{\circ}\text{C}$. an sichtbar zu werden) gerinnendes Globulin übergeht. Diese Angaben von Denis gelten nun allerdings für Fibrin aus venösem Menschenblut; ich kann aber daran erinnern, dass ich aus Pferdeblutfibrinogen durch passende Abänderung des Alkaligehaltes bei der Gerinnung ein Fibrin von der Leichtlöslichkeit des *fibrine concrète pure* habe darstellen können.³⁾

1) Vergl. Pflüger's Archiv, Bd. XXX, S. 479.

2) Nouvelles études chimiques, physiologiques et médicales sur les substances albuminoïdes, Paris 1856.

3) Vergl. Pflüger's Arch., Bd. XXX.

Wenn ich dies alles in Erwägung ziehe, muss ich bei meiner früheren Anschauung, dass eine Spaltung des Fibrinogens bei der Fibrinbildung nicht sicher bewiesen ist und dass das Fibringlobulin vielleicht nur ein umgewandelter Rest des in Lösung gebliebenen Fibrins sei, stehen bleiben.

Der Umstand, dass man unter günstigen Bedingungen mehr als 80 oder 90% des Fibrinogens als Fibrin wiedergewinnen kann, spricht nach meiner Ansicht sehr dafür, dass die Fibrinbildung eher ein der Hitze gerinnung der Eiweissstoffe analoger Vorgang als eine hydrolytische Spaltung ist. Wenn man eine Eiweisslösung durch Erhitzen coaguliert, kann man durch Abstumpfen des Alkalis und durch eine richtige Wahl des Salzgehaltes das Eiweiss so vollständig ausfällen, dass viel weniger als 1% desselben in Lösung bleibt, d. h. dass also gegen 100% des Eiweisses in die geronnene Modification übergehen. Hier ist wohl nicht eine hydrolytische Spaltung anzunehmen, und man kann vielmehr an eine Umlagerung innerhalb des Moleküles denken. Wenn man bei der Coagulation einer Eiweisslösung nicht mit hinreichender Geschicktheit arbeitet, können so grosse Mengen eines in Folge des Erhitzens veränderten Eiweisses in Lösung bleiben, dass der mit den Bedingungen für eine möglichst vollständige Gerinnung nicht hinreichend Vertraute, leicht zu der Annahme eines Spaltungsvorganges verleitet werden könnte. In analoger Weise ist es sehr wohl denkbar, dass die unvollständige Ausfällung des Fibrinogens als geronnenes Fibrin bei der Fibrinbildung nur darin ihren Grund hat, dass wir die für eine möglichst vollständige Gerinnung erforderlichen äusseren Bedingungen noch nicht herstellen können.

Die bisherigen Elementaranalysen des Fibrinogens und des Fibrins scheinen übrigens mindestens ebenso gut einer intramolekularen Umlagerung wie einer hydrolytischen Spaltung das Wort zu reden. In Anbetracht dessen, dass das Fibrinogen und das Fibrin amorphe Stoffe sind, deren völlige Reinheit nicht genau kontrolliert werden kann, will ich den Elementaranalysen derselben kein sehr grosses Gewicht zumessen; wenn man aber die für beide Stoffe (aus

Pferdeblutplasma) gefundenen Zahlen mit einander vergleicht, so findet man:

	Fibrin	Fibrinogen	Differenz
C	52,68	52,90	0,22
H	6,82	6,89	0,07
N	16,91	16,68	0,23
S	1,10	1,25	0,15

Die Differenzen liegen also innerhalb der Fehlergrenzen und sind überhaupt so klein, dass die beiden Stoffe sehr wohl dieselbe Zusammensetzung haben könnten. Vergleicht man ferner die von Schmiedeberg für das Fibrin berechnete Formel $C_{108}H_{162}N_{30}SO_{34}$ mit den für diese Substanz thatsächlich gefundenen Zahlen, so findet man Differenzen, die ebenso gross wie die zwischen Fibrinogen und Fibrin gefundenen sind.

	Berechnet	Gefunden	Differenz
Fibrin C_{108}	52,81	52,68	0,13
H_{162}	6,60	6,82	0,22
N_{30}	17,11	16,91	0,20
S	1,20	1,10	0,20

Es ist selbstverständlich auch leicht, eine Grundformel zu construiren, die zu der gefundenen Zusammensetzung sowohl des Fibrins wie des Fibrinogens besser als die Schmiedeberg'sche Grundformel des Fibrins zu der gefundenen Zusammensetzung dieses Stoffes passt.

Wenn man sich an die Elementaranalysen hält, so würde man also eigentlich nur die abweichende Zusammensetzung des Fibringlobulins als Stütze für die Annahme einer hydrolytischen Spaltung bei der Fibrinbildung ins Feld führen können. Da aber das Fibringlobulin nur durch einen niedrigeren Stickstoffgehalt von dem Fibrinogen und Fibrin sich unterscheidet, da ein Theil des Stickstoffes leicht aus einem Eiweisskörper ohne hydrolytische Spaltung austreten kann, und da vor Allem durch die bei der Gerinnung entstehenden grossen Faserstoffmengen eine nach der obigen Formelgleichung stattfindende Spaltung ausgeschlossen ist, kann ich der etwas abweichenden Zusammensetzung des Fibringlobulins als Beweis für eine hydrolytische Spaltung des Fibrinogens keine Bedeutung zuerkennen.

Als einen weiteren Grund für die Annahme einer hydro-

lytischen Spaltung bei der Fibrinbildung könnte man jedoch vielleicht auch den Umstand anführen wollen, dass die Caseingerinnung mit Lab, die ein verwandter Vorgang zu sein scheint, der allgemeinen Ansicht nach eine hydrolytische Spaltung ist. Aber auch diese Ansicht ist nicht hinreichend begründet. Es sprechen allerdings mehrere Beobachtungen für dieselbe; bewiesen ist sie aber nicht, und auch hier kann man daran denken, dass das sogenannte Molkeneiweiss nur ein Rest von in Lösung gebliebenem und verändertem Casein, bezw. Paracasein ist. Nach den Bestimmungen von Hillmann¹⁾ können bei der Gerinnung der Milch mit Lab von dem Casein mehr als 90^o/_o, sogar 96—97^o/_o als Paracasein sich ausscheiden, und auch hier kann die Menge des Paracaseins in Procenten von dem Casein je nach den Versuchsbedingungen recht bedeutend wechseln. Es ist also recht wohl denkbar, dass es bei der Caseingerinnung nicht um eine hydrolytische Spaltung, sondern um eine intramolekulare Umlagerung oder um irgend welche andere, noch unbekannte Umwandlung des Caseins sich handelt. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass die gegenwärtig ganz unbekannte Wirkungsweise der, eine Eiweissgerinnung erzeugenden sogenannten Enzyme ganz anderer Art als die der hydrolytisch wirkenden Enzyme ist.

Mit dem nun Gesagten will ich nicht die Möglichkeit in Abrede gestellt haben, dass die Fibrinbildung ein Spaltungsvorgang sein kann. Weil aber eine solche Annahme eine sehr zusagende ist und darum auch allmählich leicht als etwas Bewiesenes angesehen werden dürfte, muss ich entschieden hervorheben, dass die bisher bekannten Thatsachen zu einem solchen Schlusse nicht berechtigen. Die Lehre von der Faserstoffgerinnung hat leider schon gar zu viele unrichtige oder unbewiesene Theorien aufzuweisen, und der Grund hierzu liegt zum grossen Theil darin, dass man aus richtigen Beobachtungen seine Schlussfolgerungen oft zu rasch und ohne genügende Vorsicht gezogen hat.

1) Paul Hillmann, Beiträge zur Kenntniss der Wirkung des Labferments auf die Eiweissstoffe der Milch. Sonderabdruck aus Mittheilungen des landw. Instituts der Universität Leipzig 1897.

Zur Kenntniss der Pseudonucleine.

Von

K. H. Giertz, stud. med.

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der Universität Upsala.)

(Der Redaction zugegangen am 30. Juni 1899.)

Bei seinen Untersuchungen über die Amyloidsubstanz hat Krawkow¹⁾ als Trennungsmittel des Amyloids von den Nucleinen das Barytwasser benutzt, von dem das Amyloid, nicht aber das Nuclein gelöst wird. Krawkow hat auch das Verhalten des Pseudonucleins (aus Casein) zu Barytwasser geprüft und er ist zu dem Resultate gelangt, dass sowohl die echten Nucleine wie die Pseudonucleine in Barytwasser unlöslich sind.

Diese letzte Angabe steht in scharfem Gegensatz zu der Erfahrung von Professor Hammarsten, welcher das Pseudonuclein aus Casein immer sehr leicht löslich in Barytwasser fand, und aus diesem Grunde forderte er mich auf, die Ursache dieses Widerspruches, wenn möglich, zu erforschen und auch andere Pseudonucleine in dieser Beziehung zu studiren.

Mein erstes Untersuchungsobject war das aus Casein dargestellte Pseudonuclein. Es wurde, wie gewöhnlich, durch Verdauung von Casein mit Pepsinchlorwasserstoffsäure gewonnen und durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit möglichst wenig Alkali, Wiederausfällen mit Säure und gründliches Auswaschen gereinigt. Um jede Verunreinigung mit ungelöstem

¹⁾ Beiträge zur Chemie der Amyloidartung. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. XXXX.

Casein schon von Anfang an ausschliessen zu können, wurde das Casein stets vor der Verdauung in der verdünnten Säure gelöst und dann die saure Pepsinlösung zugefügt. In allen diesen vorläufigen Versuchen war das Pseudonuclein, den Erfahrungen von Hammarsten entsprechend, in Barytwasser sehr leicht und vollständig löslich.

Die einander widersprechenden Erfahrungen von Krawkow und Hammarsten mussten also in einer verschiedenen Versuchsanordnung ihren Grund haben, und ich suchte deshalb zuerst den Einfluss eines verschiedenen Säuregrades zu ermitteln. Ich stellte also zuerst einige Versuchsreihen mit resp. 0,10-, 0,25- und 0,50 %iger Chlorwasserstoffsäure und Pepsin unter sonst ganz gleichen Verhältnissen an, erhielt aber immer ein Pseudonuclein, welches von dem Barythydrate leicht und vollständig gelöst wurde, gleichgültig, ob ich das Barythydrat nur bis zu schwach alkalischer Reaction oder im Ueberschuss zugesetzt hatte.

Demnächst variierte ich die Versuchsdauer, indem ich die Pepsinchlorwasserstoffsäure verschieden lange Zeit, bezw. 24, 36, 48 und 72 Stunden einwirken liess. Dies änderte aber an den Resultaten nichts. Das Nuclein war immer leicht löslich in Barytwasser.

Bevor ich weiter gehe, muss ich an der Art und Weise, wie Krawkow die Löslichkeit des Pseudonucleins in Baryt geprüft hat, erinnern. Krawkow sagt hiervon nur, dass er das Pseudonuclein mit Barytwasser behandelte und dass die abfiltrirte alkalische Flüssigkeit nach Salzsäurezusatz selbst nach einigem Stehen keine Fällung gab. Ich habe mich von der Löslichkeit des Pseudonucleins in Barytwasser sowohl direkt wie durch Prüfung des Filtrates mit Salzsäure, wobei ich immer eine Fällung erhielt, überzeugen können. Hierbei muss ich aber sogleich bemerken, dass die Ausfällung mit Salzsäure stets unmittelbar nach der Auflösung und der Filtration geschah.

Da also die abweichenden Resultate Krawkow's weder durch einen verschiedenen Säuregrad der angewendeten Pepsinchlorwasserstoffsäure noch durch eine verschieden lange Verdauungszeit zu erklären waren, blieb es noch zu prüfen, in

wie weit sie in einer verändernden Einwirkung des Barythydrates auf das Pseudonuclein — sei es durch Anwendung einer zu concentrirten Barytlösung oder durch eine zu andauernde Einwirkung derselben — zu suchen sind. Es zeigte sich auch in der That, dass das Caseinpseudonuclein von dem Barytwasser leicht verändert wird. Unter dem Einflusse des Baryumhydrates wird es nämlich schon bei Zimmertemperatur verhältnissmässig rasch zersetzt, und es entstehen hierbei Spaltungsprodukte, die bei Zusatz von Salzsäure zu dem alkalischen Filtrate keine Fällung geben. Die Geschwindigkeit, mit welcher diese Zersetzung stattfindet, hängt selbstverständlich von der Concentration der angewandten Barytlösung ab; bei der Einwirkung von kalt gesättigtem Barytwasser findet aber eine durch eine auftretende Trübung sich kundgebende Zersetzung des Pseudonucleins schon nach 3 Stunden bei Zimmertemperatur statt.

Die hierbei entstehenden Spaltungsprodukte sind je nach der Intensität der Barytwirkung, d. h. je nach der Relation zwischen Pseudonuclein und Barythydrat etwas verschieden. Setzte ich z. B. einer 1%igen Pseudonucleinlösung, die durch Auflösung dieses Stoffes in Wasser mit möglichst wenig Barythydrat dargestellt worden war, das gleiche Volumen einer kalt gesättigten Barytlösung hinzu, so konnte ich schon nach einigen Stunden die Ausscheidung einer aus Baryumorthophosphat und Eiweiss bestehenden Fällung beobachten. In einer 2%igen Pseudonucleinlösung trat dagegen durch die Einwirkung von derselben Menge Barythydrat kein Niederschlag auf; die Spaltung hatte aber auch in diesem Falle stattgefunden, denn bei vorsichtiger Neutralisation mit Salzsäure schied sich eine, in dem geringsten Ueberschusse der Säure leicht lösliche, acidalbuminatähnliche Substanz aus und das Filtrat hiervon enthielt Baryumorthophosphat und albumoseähnliche Substanz. In beiden Fällen spaltet sich also Baryumorthophosphat ab, dessen Ausfällung indessen durch das abgespaltene Eiweiss oder durch rückständiges, noch nicht zersetztes Pseudonuclein mehr oder weniger vollständig verhindert werden kann.

Wie durch Baryumhydroxyd kann das Pseudonuclein

auch durch Natronlauge (bis zu 2 % oder darüber) leicht gespalten werden.

Die durch Baryteinwirkung entstehenden eiweissartigen Spaltungsprodukte des Pseudonucleins habe ich keiner mehr eingehenden Prüfung unterzogen, denn es war für meinen Zweck hinreichend, die rasche Zersetzung des Pseudonucleins durch Barytwasser zu zeigen. In dieser zersetzenden Einwirkung des Barythydrates hat man nämlich allem Anscheine nach die Erklärung der von Krawkow erhaltenen Resultate zu suchen. Er behandelte, wie oben gesagt, das Pseudonuclein mit Barythydrat, konnte dann in dem Filtrate durch Zusatz von Salzsäure kein Pseudonuclein nachweisen und zog hieraus den Schluss, dass das Pseudonuclein von dem Barytwasser nicht gelöst worden war. Wie lange er hierbei das Barytwasser einwirken liess, hat er nicht angegeben, und es ist also sehr wohl möglich, dass er das letztere eine für die Zersetzung hinreichend lange Zeit hat einwirken lassen. Wenn dies der Fall gewesen ist, sind aber seine Resultate leicht erklärlich. Es konnte nämlich hierbei entweder Acidalbuminat, welches schon von dem allerkleinsten Säureüberschuss gelöst wird oder auch Albumose entstanden sein; und in beiden Fällen konnte also beim Ansäuern des Filtrates mit Salzsäure kein Niederschlag zum Vorschein kommen. Aus dem Umstande, dass er in dem Filtrate nach der Baryteinwirkung keine Fällung nach Salzsäurezusatz erhielt, lässt sich also nicht der Schluss ziehen, dass das Pseudonuclein eine in Barytwasser unlösliche Substanz ist. In einem solchen Filtrate kann man leicht durch die Heller'sche Probe den Nachweis von Eiweiss führen.

Das Pseudonuclein aus Casein ist also eine in Barytwasser leicht lösliche Substanz, die indessen von überschüssigem Baryt leicht denaturirt und zersetzt wird.

Für die echten Nucleine hat dagegen die Angabe von Krawkow ihre volle Gültigkeit, was ich durch besondere Versuche mit echten Nucleinen aus Leber, Milz, Niere, Thymus und Pankreas habe constatiren können. Diese Nukleine waren, wenn völlig rein, in Barytwasser vollständig unlöslich und sie wurden davon bei Zimmertemperatur nicht zersetzt.

In dem Verhalten zu Barytwasser besteht also ein wesentlicher Unterschied zwischen echten Nucleinen und dem Caseinpseudonuclein. Es war deshalb von Interesse, das Verhalten auch anderer Pseudonucleine dem Barytwasser gegenüber zu prüfen.

Das nächste von mir untersuchte Pseudonuclein war das aus dem Vitellin des Eidotters durch Pepsinverdauung dargestellte Pseudonuclein (Bunge's Hämatogen). Durch vollständiges Erschöpfen des Eigelbs mit Aether bei Zimmertemperatur wurden Fett und Farbstoff möglichst vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in Salzsäure von 0,1% gelöst, die Lösung filtrirt und nach Zusatz von Pepsinlösung bei 40° C. während 24 Stunden verdaut. Das hierbei sich ausscheidende, sorgfältig ausgewaschene Pseudonuclein löste sich leicht in Wasser nach Zusatz von Alkali oder Barytwasser zu sehr schwach alkalischer Reaction, und aus dieser Lösung schied es sich nach Zusatz von Salzsäure zu 0,25% wieder reichlich aus. Es war aber dieses Pseudonuclein gegen die Einwirkung des Barythydrates derart empfindlich, dass, wenn es mit kalt gesättigtem Barytwasser direkt behandelt wurde, das Filtrat nunmehr kein mit Salzsäure fällbares Pseudonuclein mehr enthielt. Bei Prüfung mit der Heller'schen Probe erwies es sich dagegen als eiweisshaltig, und es hatte also eine Spaltung des Hämatogens stattgefunden. Die Zersetzlichkeit dieses Pseudonucleins ist aber so gross, dass eine mit Barythydrat zu nur schwach alkalischer Reaction bereitete Lösung desselben nach einigem Stehen nicht mehr durch Salzsäure gefällt wird; und selbst durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit möglichst wenig Alkali und Wiederausfällung mit Salzsäure kann es derart verändert werden, dass es in Barytwasser unlöslich wird. Das Pseudonuclein aus Vitellin (das Hämatogen) zersetzt sich also viel leichter als das Caseinpseudonuclein.

Mit dieser leichten Zersetzung des Hämatogens und dem Auftreten dabei von einem in Barytwasser unlöslichen Produkt steht auch die Beobachtung in gutem Einklang, dass das aus gekochtem Eidotter nach erschöpfender Alkoholätherbehandlung durch Pepsinverdauung gewonnene Pseudonuclein in Barytwasser unlöslich war, während es dagegen in Wasser nach

Zusatz von ein wenig Alkali sich löste. Ueber die Art dieser in Barytwasser unlöslichen Substanz wie auch der durch Barythydrat erzeugten Zersetzungsprodukte des Vitellinpseudonucleins überhaupt habe ich keine Untersuchungen gemacht.

Geht man von gekochtem Casein aus, so erhält man dagegen ein Pseudonuclein, welches, wie das gewöhnliche, sehr leicht löslich in Barytwasser ist, und die beiden Pseudonucleine aus Casein und Vitellin verhalten sich also wesentlich verschieden. Das aus nativem, nicht geronnenem Vitellin dargestellte Pseudonuclein ist aber ebenfalls eine in verdünntem Barytwasser lösliche Substanz.

Aus dem, nach den Untersuchungen von Paykull, in dem Gallenschleime wie in der Gallenblasenschleimhaut vorkommenden Nucleoalbumin habe ich ebenfalls ein Pseudonuclein dargestellt und dessen Verhalten zu Barytwasser geprüft. Dieses Pseudonuclein steht dem Pseudonuclein aus Casein viel näher als dem aus Vitellin. Es ist leicht und vollständig löslich in Barytwasser und kann durch Salzsäurezusatz wieder aus dieser Lösung ausgefällt werden.

Nach dem oben Mitgetheilten sind also die echten Nucleine, so weit sie bisher untersucht worden, sämmtlich in Barytwasser unlöslich. Die Pseudonucleine sind dagegen, so weit meine bisherigen Erfahrungen reichen und so lange diese Stoffe noch nicht ihre typische Beschaffenheit eingeübt haben, in Barytwasser löslich. Sie sind aber, der Einwirkung von Barytwasser gegenüber, sehr empfindlich und werden durch dasselbe bei Zimmertemperatur leicht zersetzt.

Das Verhalten zu Barytwasser kann also als vorläufige Reaction zur Entscheidung, ob ein Pseudonuclein oder ein echtes Nuclein vorliegt, benutzt werden. Löslichkeit der fraglichen Substanz in Barytwasser spricht entschieden für die Anwesenheit eines Pseudonucleins, während Unlöslichkeit derselben, bezw. die Nichtfällbarkeit des Filtrates durch Salzsäurezusatz — in Folge der leichten Zersetzung des Pseudonucleins — mit gewisser Vorsicht beurtheilt werden muss. Um eine solche Zersetzung möglichst zu vermeiden, sollte man hierbei übrigens nicht zu viel Barytwasser zusetzen.

In dem ungleichen Verhalten zu Barytwasser könnte man vielleicht auch ein Mittel zur Trennung der Pseudonucleine von den echten Nucleinen sehen wollen, und dies trifft in der That auch, wenigstens für gewisse Fälle, zu. Ich habe nämlich Pseudonuclein aus Casein oder aus sogenanntem «Gallenschleim» mit echtem Nuclein aus Pankreas oder Nieren zusammen gemischt und dann dieses Gemenge mit Barytwasser geprüft. Ich konnte hierbei das Pseudonuclein leicht in dem Filtrate nachweisen, während das echte Nuclein ungelöst zurückblieb. Auch hier ist es anzurathen, einen Ueberschuss von Barytwasser zu vermeiden.

Im Anschluss an die nun mitgetheilten Untersuchungen habe ich auch einige vergleichende Versuche mit durch Pepsinverdauung erhaltenem Pseudonuclein und den durch Fällung von Eiweisslösungen mit Metaphosphorsäure dargestellten, von Liebermann als Nucleinsubstanzen bezeichneten Verbindungen angestellt. Dass das echte Nuclein keine Verbindung von Eiweiss mit Metaphosphorsäure sein kann, ist schon längst von Kossel bewiesen worden. Für die Pseudonucleine, die als Spaltungsprodukte keine Nucleinbasen liefern und die, wie Liebermann gezeigt hat, in mehreren Beziehungen den Eiweissmetaphosphorsäureverbindungen ähnlich sind, müssten aber weitere Untersuchungen wünschenswerth erscheinen. Diese Verbindungen ähneln den Pseudonucleinen auch darin, dass sie in Barytwasser löslich sind; dass sie trotzdem aber mit ihnen nicht identisch sein können, dürfte aus den folgenden Beobachtungen hervorgehen.

Wenn man Pseudonuclein aus Casein in Wasser mit Hilfe von Natronlauge zu einer neutralen Flüssigkeit löst und darauf Natronlauge zu 0,1% hinzufügt, so spaltet sich aus dem Pseudonuclein keine Phosphorsäure ab. Dem entsprechend kann man diese Lösung tagelang gegen Wasser dialysiren, ohne dass in den sehr stark concentrirten und nach Salpetersäurezusatz gekochten Diffusaten eine Spur von Orthophosphorsäure nachzuweisen ist. Ganz anders verhält sich aber das aus Hühner- oder Serumeiweiss durch Fällung mit Metaphosphorsäure dargestellte, sogenannte Pseudonuclein. Löst man solches,

künstliches Pseudonuclein, welches vorher durch wiederholtes Auflösen und Ausfällen und durch sehr sorgfältiges Auswaschen von anhaftender, freier Metaphosphorsäure vollständig befreit worden ist, in Wasser mit Hilfe von Alkali in ganz derselben Weise wie das Caseinpseudonuclein und dialysirt, so kann man dagegen sogar in dem nicht concentrirten Diffusate recht bald das Vorkommen von reichlichen Mengen Phosphat nachweisen.

Zu demselben Resultate führt auch das folgende Verfahren. Aus einer schwach alkalischen Lösung von künstlichem Pseudonuclein scheidet man durch Sättigung mit Ammoniumsulfat sämtliches Eiweiss aus, und in dem Filtrate kann man nun sehr leicht die Anwesenheit von Alkaliphosphat zeigen. Fällt man aus einer entsprechenden Lösung von Caseinpseudonuclein alles Eiweiss mit Ammoniumsulfat aus, so lässt sich dagegen in dem Filtrate keine Spur von Phosphorsäure nachweisen.

Das künstliche Pseudonuclein ist also eine salzähnliche Verbindung zwischen Eiweiss und Metaphosphorsäure, die beim Auflösen in alkalihaltigem Wasser in Alkaliphosphat und Eiweiss, das letztere vielleicht als eine lösliche Alkaliverbindung, sich umsetzt. Das Pseudonuclein (aus Casein) enthält dagegen keine derart gebundene Metaphosphorsäure. Es ist also nicht mit dem künstlichen Pseudonuclein identisch und es kann keine Verbindung zwischen Eiweiss und Metaphosphorsäure sein.

Der Nachweis der Glutaminsäure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten des thierischen Eiweisses.

Von

Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juli 1899.)

Die Glutaminsäure wurde bekanntlich zuerst von Ritthausen aus einer Reihe pflanzlicher Eiweissstoffe, die durch Kochen mit starker Schwefelsäure zersetzt waren, gewonnen. Dagegen haben Ritthausen, Kreuzler,¹⁾ Hlasiwetz und Habermann²⁾ sich vergeblich bemüht, die gleiche Säure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper ebenfalls nachzuweisen, und es ist das auch bis heute noch nicht gelungen.

Auf Grund dieser Befunde war Ritthausen³⁾ geneigt, einen tiefgehenden Unterschied in der Constitution der animalen und pflanzlichen Proteinstoffe anzunehmen.

Nachdem jedoch Hlasiwetz und Habermann⁴⁾ durch anhaltendes Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür aus thierischen Proteinstoffen Glutaminsäure in sehr reichlicher Menge darzustellen vermochten, betonte Ritthausen⁵⁾ die bei der Spaltung mit Schwefelsäure sich ergebenden Differenzen zwischen thierischen und pflanzlichen Eiweisskörpern nicht mehr. Meiner

1) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 221.

2) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 248.

3) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 236.

4) Liebig's Annalen, Bd. 169, 1873, S. 150.

5) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., S. 248.

Ansicht nach mit Unrecht. Denn würden in Wirklichkeit die thierischen Proteinstoffe bei der Spaltung durch Schwefelsäure ein so wohl charakterisiertes Spaltungsprodukt wie die Glutaminsäure ganz vermissen lassen, dann müssten wir wohl oder übel wesentliche Unterschiede in der Configuration der Moleküle der pflanzlichen und der thierischen Eiweisskörper annehmen. Weiter müssten wir, um das reichliche Auftreten der Glutaminsäure bei der Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch Salzsäure zu erklären, grosse qualitative Differenzen in der Wirkungsweise der Salz- und Schwefelsäure voraussetzen, während das Erscheinen aller anderen wohl charakterisierten Spaltungsprodukte, wie des Tyrosin, Leucin etc., welche sich aus pflanzlichen und thierischen Eiweisskörpern bilden, gleichgültig ob man die Spaltung mit Salzsäure oder Schwefelsäure vornimmt, höchstens auf quantitative, nicht aber qualitative Unterschiede in den beiden Spaltungsmethoden hinweist.

Bei meinen Arbeiten über das «Antipepton»¹⁾ war mir die grosse Aehnlichkeit aufgefallen, die sich in dem Abbau der Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure und das tryptische Ferment der Bauchspeicheldrüse zeigt. Dieselbe geht so weit, dass wir beispielsweise eine alte Schilderung Ritt-hausens über den nach Auskrystallisation von Leucin und Tyrosin bleibenden Rest der Zersetzungsprodukte des mit Schwefelsäure gesprengten Legumins direkt auf das «Antipepton» anwenden können. Die Angaben Ritthausen's²⁾ lauten wie folgt:

«Nach Ausscheidung von Tyrosin und Leucin aus der Zersetzungsflüssigkeit sind andere feste Körper auf keine Weise, weder durch Stehen, Abkühlen oder Behandeln mit Alkohol zu gewinnen.

Es gab der bedeutende Rest (von 60 g Erbsenlegumin ca. 28 g) eine schmierige, gelbliche Masse, bei der Analyse, nachdem bei 100° C. im Wasserstoffstrom getrocknet war, 44,42% C, 7,18% H, 15,66% N.»

¹⁾ Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 110. Die Endprodukte der Trypsinverdauung, Strassburg 1899.

²⁾ Journal für prakt. Chemie, Bd. 103, Jahrg. 1868, S. 236.

Auch das «Antipepton» soll nach Kühne die Hälfte des durch Trypsin zersetzten Eiweisses ausmachen. Es präsentirt sich gewöhnlich in Form einer schmierigen gelblichen Masse, und die Analysenwerthe können sich zum Theil bis in die zweite Decimale mit den von Ritthausen angeführten decken, wie sich aus nachstehender kleiner Tabelle ergibt.

	Von Ritthausen analys. Rest	Von Kühne) analys. Drüsenpepton
C	44,42%	44,35%
H	7,18%	7,00%
N	15,66%	15,63%

Nun war es mir ohne besondere Schwierigkeit gelungen, aus dem «Antipepton» nach Entfernung der in demselben steckenden organischen Basen die Glutaminsäure in Form ihrer Silberverbindung auszufällen und aus derselben rein zu gewinnen.²⁾ Der Gedanke lag danach nahe, unter Anwendung der gleichen Methode nochmals die Isolirung der Glutaminsäure unter den mit Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper zu versuchen.

Das Material für meine Versuche war mir in freundlicher Weise von Herrn Halsey, Assistenten am hiesigen pharmakologischen Institut, zur Verfügung gestellt worden, wofür ich ihm meinen verbindlichsten Dank ausspreche. Herr Halsey hatte zu anderem Zweck 300 g Casein nach dem Verfahren von Ritthausen³⁾ mit Schwefelsäure gespalten, (Herr Halsey hatte die Schwefelsäure etwas länger wie Ritthausen auf das Casein einwirken lassen, nämlich 10—14 Stunden) einen grossen Theil der organischen Basen durch Phosphorwolframsäure ausgefällt, das Filtrat von den Phosphorwolframverbindungen mit Baryt genau von Schwefelsäure und überschüssiger Phosphorwolframsäure befreit und danach aus demselben Leucin und Tyrosin durch Krystallisation entfernt. Die Mutterlauge von

1) Zeitschrift für Biologie, Bd. XXIX, Jahrg. 1892, S. 323.

2) S. die Endprodukte der Trypsinverdauung, Strassburg 1899.

3) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., S. 213.

den letzten Leucinkrystallisationen wurde mir von Herrn Halsey übergeben. Die Reaction der Flüssigkeit war gegen mein Erwarten schwach alkalisch. Es hatte also die Fällung mit Phosphorwolframsäure nicht genügt, um die bei der Spaltung des Caseins entstehenden Basen so weit zu entfernen, dass die bei der Spaltung ebenfalls entstehenden Säuren die Ueberhand erhielten.

Um aus der Flüssigkeit die Glutaminsäure zu gewinnen, verdünnte ich sie zunächst auf einen Liter, erhitzte sie in einer Perzellanschale zum Sieden und trug kohlen-saures Kupfer bis zur Sättigung ein. Die heisse Flüssigkeit filtrirte ich vom überschüssigen Kupfercarbonat ab. Nach dem Erkalten fällte ich vorsichtig mit Bleiessig unter Vermeidung eines Ueberschusses des genannten Reagens. Die sehr voluminöse Fällung (Fällung I) wurde abfiltrirt, gut ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Vom Schwefelblei wurde abgesaugt, die erhaltene Flüssigkeit stark concentrirt, worauf sie binnen 12 Stunden zu einer blättrigen weichen Krystallmasse erstarrte. Um aus derselben gut charakterisirte Substanzen abzuscheiden, nahm ich die ganze Masse mit heissem Wasser wieder auf, erhitzte zum Kochen und gab Kupfercarbonat im Ueberschuss zu der siedenden Flüssigkeit. Vom ungelösten Kupfercarbonat wurde heiss abfiltrirt. Nachdem ich das Filtrat stark concentrirt hatte, schied sich noch während des Erkaltes in sechsseitigen Blättchen eine Verbindung ab, die nur Spuren von Kupfer aufgenommen hatte. Sie liess sich durch schnelles Absaugen von der Mutterlauge trennen, bevor sich aus derselben wesentliche Mengen anderer Substanzen abgeschieden hatten. Durch Umkrystallisiren aus verdünnter Salzsäure wurde sie leicht in schneeweissen, kupferfreien Blättchen gewonnen. Ich habe sie bisher nicht näher untersucht, doch scheint es sich um eine reichlich Phosphor enthaltende Verbindung zu handeln.

Die kupferhaltige Mutterlauge davon erstarrte nach einiger Zeit zu einem Krystallbrei, welcher der Hauptsache nach aus den charakteristischen Nadelbüscheln des asparaginsäuren Kupfers gebildet war (s. die Analyse S. 129). Die Ausbeute davon betrug 2,49 g. Auch das asparaginsäure Kupfer wurde

abgesaugt. Aus dem davon erhaltenen, noch tiefblau gefärbten Filtrat wurde das Kupfer durch Schwefelwasserstoff entfernt. Die vom Schwefelkupfer befreite und concentrirte Flüssigkeit setzte nach kurzer Zeit kleine, stark glänzende, in kaltem Wasser schwer lösliche Krystalle in reichlicher Menge ab. Dieselben waren nach einmaliger Umkrystallisation aus wenig siedendem Wasser analysenrein. Die Ausbeute betrug 1,49 g.

Bei der Analyse gaben 0,2146 g Substanz 0,3193 g Kohlensäure und 0,1175 Wasser.

Für $C_5H_9NO_4$

Berechnet:

C = 40,81 %

H = 6,12 %

Gefunden:

C = 40,59 %

H = 6,13 %

Um das Resultat dieser Analyse, nach der die isolirte Substanz freie Glutaminsäure sein musste, noch mehr zu stützen, führte ich einen kleinen Theil der Verbindung in das salzsaure Salz über.

Davon gaben 0,207 g an AgCl 0,1632 g.

Für $C_5H_9NO_4.HCl$

Berechnet:

Cl = 19,34 %

Gefunden:

Cl = 19,49 %

Der Schmelz- und Zersetzungspunkt der salzsauren Verbindung lag bei 191° C. (uncorrig.), während salzsaure Glutaminsäure bei 193° C. unter gleichzeitiger Zersetzung schmilzt.

Durch vorstehende Daten war die Frage, ob die Glutaminsäure auch bei der Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure entsteht oder nicht, bereits entschieden. Um jedoch ihre bei der Zersetzung des Caseins durch Schwefelsäure auftretende Menge möglichst quantitativ zu bestimmen, versuchte ich noch auf das Filtrat von Fällung I das von mir bei meinen Arbeiten über das «Antipepton» geübte Verfahren der Abscheidung der Glutaminsäure in Form ihrer Silberverbindung anzuwenden.

Zu diesem Zweck schied ich aus dem Filtrat von Fällung I Blei und Kupfer durch Schwefelwasserstoff ab. Darauf concentrirte ich es stark, um die aus dem Bleiessig stammende Essigsäure möglichst zu entfernen. Schliesslich füllte ich es

auf 250 ccm. auf. Davon verarbeitete ich 125 ccm. Dieselben liessen auf Zusatz von 10 % Silbernitratlösung zunächst einen geringen, sich schnell schwärzenden Niederschlag fallen. Derselbe wurde abfiltrirt, das Filtrat von Neuem mit Silbernitratlösung versetzt. Nachdem ich ca. 10 g Silbernitrat in Lösung zugefügt hatte, begann sich eine weisse Fällung abzuscheiden, die sich auf weiteren Zusatz von Silbernitratlösung noch vermehrte. Erst die Anwendung von 22 g Silbernitrat genügte, um diese Fällung (Fällung II) zu beenden.

Fällung II wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus der vom Schwefelsilber ablaufenden Flüssigkeit krystallisirte nach der Concentration in kleinen, aus feinen Nadeln bestehenden Drusen eine in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche Substanz, deren Analyse für eine molekulare Verbindung von Glutaminsäure und Asparaginsäure sprach.

Es gaben nämlich 0,1518 g Substanz bei der Verbrennung 0,2236 g Kohlensäure und 0,0849 g Wasser.

0,1646 g Substanz lieferten bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung 14,2 ccm. Stickstoff bei 13° C. und 746 mm. Barometerstand, als Sperrflüssigkeit diente 25 % ige Kalilauge.

Für $(C_5H_7NO_4)_x \cdot C_4H_7NO_4$

Berechnet:	Gefunden:
C = 40,09 %	C = 40,18 %
H = 5,99 %	H = 6,26 %
N = 9,68 %	N = 10,05 %

Die Ausbeute an dieser Substanz hatte ca. 0,7 g betragen. Von den in ihr vorhandenen Componenten vermochte ich jedoch nur mit Sicherheit die Glutaminsäure nachzuweisen. Denn als ich versuchte, dieselben durch ihre Kupferverbindungen zu trennen, schied sich wider Erwarten zunächst ein in Wasser unlösliches Kupfersalz der Glutaminsäure ab und es gelang mir, nur 0,049 g eines in Wasser löslichen Kupfersalzes zu erhalten, das in lufttrockenem Zustand bei der Analyse 0,0134 g Kupferoxyd, also nur 21,84 % Kupfer, enthielt, während lufttrockenes asparaginsaures Kupfer 23,02 % verlangt.

Aus der in Wasser unlöslichen Kupferverbindung liess sich dagegen nach der Entkupferung durch Schwefelwasserstoff die salzsaure Verbindung der Glutaminsäure darstellen.

Es gaben davon 0,2114 g Substanz 0,1685 g Chlorsilber.

Für $C_6H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:	Gefunden:
Cl = 19,34 %	Cl = 19,59 %

Das Filtrat von Fällung II, das noch den Haupttheil der Glutaminsäure enthalten musste, fällte ich schliesslich durch abwechselnden vorsichtigen Zusatz von Baryt- und Silbernitratlösung. Die ausgefallenen Silberverbindungen wurden abfiltrirt, ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelsilber ablaufende Flüssigkeit wurde durch Schwefelsäure genau vom Baryt befreit und erstarrte nach ihrer Concentration zu einer weichen Krystallmasse. Aus derselben schied ich die Asparaginsäure in Form ihres Kupfersalzes, die Glutaminsäure als freie Glutaminsäure nach dem zur Trennung des aus der Bleifällung erhaltenen Gemenges benutzten Verfahren ab. Ich gewann schliesslich aus der Silberfällung 1,23 g asparaginsaures Kupfer und 1,98 g freie Glutaminsäure.

Zur Analyse mengte ich das aus der Blei- und Silberfällung erhaltene asparaginsäure Kupfer. Davon gaben 0,2805 g lufttrockener Substanz 0,0808 g Kupferoxyd.

Für $C_4H_8NO_4 \cdot Cu + 4 \frac{1}{2} H_2O$

Berechnet:	Gefunden:
Cu = 23,02 %	Cu = 23,00 %

Die aus der Silberfällung erhaltene Glutaminsäure identificirte ich, indem ich einen kleinen Theil in die salzsaure Verbindung überführte.

Davon gaben 0,210 g Substanz 0,1622 g Chlorsilber.

Für $C_6H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:	Gefunden:
Cl = 19,34 %	Cl = 19,10 %

Es waren demnach von den 300 g Casein durch Schwefelsäurespaltung zum Mindesten $1,49 \text{ g} + 1,98 \text{ g} \cdot 2 = 5,45 \text{ g}$ oder 1,8% Glutaminsäure geliefert worden.

Schieben wir diesen Werth in die Tabelle Ritthausen's,¹⁾ die die Ausbeute an Glutaminsäure aus den verschiedenen pflanzlichen Eiweisskörpern angibt, ein, so sehen wir, dass das Milchcasein nicht einmal zu unterst in derselben steht. Ich lasse die Tabelle²⁾ folgen:

Es gaben 100 Gewichtstheile:

1. Mucedin	25 %	Glutaminsäure,
2. Maisfibrin	10 %	„
3. Gemisch der in Weingeist löslichen Kleberproteinstoffe	8,8 %	„
4. Gluten-Casein	5,3 %	„
5. Conglutin	3—5 %	„
6. Legumin	1,5 %	„
7. Milchcasein	1,8 %	„

Es fragt sich nun, warum die Isolirung der Glutaminsäure aus den durch Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper bisher nicht gelungen ist. Ich glaube diese Frage auf Grund unserer jetzigen, durch Kossel³⁾ angebahnten Kenntnisse über die Spaltungsprodukte der thierischen Eiweisskörper durch Schwefelsäure genügend beantworten zu können. Wir wissen nämlich, dass dabei in reich-

1) Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten u. s. w., S. 222.

2) Ritthausen hat in der Tabelle Werthe zusammengestellt, die unter einander nicht eigentlich vergleichbar sind, da die Werthe von 1, 2, 3, 4, 5 nur die freie Glutaminsäure angeben, welche bei dem Mucedin u. s. w. bei der Spaltung durch Schwefelsäure entsteht. Ueber die Gesamtmenge der aus 1, 2, 3, 4, 5 hervorgehenden Glutaminsäure erfahren wir aber dadurch nichts. Dagegen entspricht beim Legumin der gefundene Werth wahrscheinlich der aus dem Legumin sich bildenden Gesamtmenge an Glutaminsäure, die beim Legumin schon völlig an basische Substanzen gebunden sein muss. Ritthausen musste daher bereits zu ihrer Isolirung die aus dem Legumin hervorgehende Glutaminsäure aus ihrer anderweitigen Bindung durch Ueberführung in das Barytsalz befreien. Das Legumin leitet also zu den thierischen Eiweisskörpern über, und der von mir für das Milchcasein bestimmte Werth bezieht sich wie beim Legumin auf die überhaupt gebildete Glutaminsäure.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 176, Bd. XXV, S. 165, und Deutsche medicinische Wochenschrift, Jahrg. 1898, Nr. 37, S. 581.

licher Menge organische Körper stark basischer Natur entstehen, die die bei der Spaltung auftretenden organischen Säuren binden müssen. Nun herrschen jedenfalls im Gegensatz zu den in der Tabelle aufgeführten pflanzlichen Eiweisskörpern bei den thierischen niemals die bei der Spaltung sich bildenden organischen Säuren vor, sondern dieselben werden wahrscheinlich immer von den organischen Basen abgesättigt. Es kann daher auch nicht freie Glutaminsäure aus den Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper, wie es bei den pflanzlichen geschieht, auskrystallisiren. Wir müssen vielmehr zwecks ihrer Isolirung zunächst die organischen Basen nach Möglichkeit entfernen und sie danach noch durch geeignete Fällungsmittel in schwerlösliche Verbindungen überführen. Diesen beiden Forderungen wurde in meinem Versuche genügt und daher gelang die Reindarstellung der Glutaminsäure aus dem durch Schwefelsäure gespaltenen Casein ohne sonderliche Mühe.

Auffallend bleibt übrigens, wie ausserordentlich die von mir an Glutaminsäure erhaltene Menge gegen die nach Salzsäurespaltung aus dem Casein gewonnene zurückbleibt, denn den bei Salzsäurespaltung aus dem Casein sich bildenden 29⁰/₀ Glutaminsäure¹⁾ stehen nur 1,8⁰/₀ gegenüber, und ich glaube nicht, dass aus dem Casein durch Spaltung mit Schwefelsäure wesentlich mehr zu erhalten ist. Die Ursache für diese gewaltige Differenz vermag ich leider noch nicht anzugeben.

Fasse ich die von mir erarbeiteten Resultate kurz zusammen, so ergibt sich,

1) dass entgegen der bisherigen Ansicht auch aus thierischen Eiweisskörpern sich bei der Spaltung durch Schwefelsäure Glutaminsäure bildet. Niemals entsteht jedoch dabei die Glutaminsäure aus den thierischen Eiweisskörpern in so grosser Menge, dass freie Glutaminsäure sich abscheiden kann,

2) dass die bei Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure zu erzielende Ausbeute an Glutaminsäure gegenüber der durch Salzsäurespaltung gewinnbaren nur eine geringe ist.

1) Hlasiwetz u. Habermann, Liebigs Annalen, Bd. 169, S. 166.

Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung.

Von

Dr. E. Zunz (Brüssel).

Mit zwei Tafeln.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge. Nr. 20.)

(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1899.)

In einer vor Kurzem erschienenen Abhandlung¹⁾ habe ich gezeigt, dass die von K. Baumann und A. Bömer²⁾ zur Fällung der Albumosen empfohlene Fällung mit Zinksulfat bei entsprechender Abänderung des Verfahrens ebenso gut zur fractionirten Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte geeignet ist, wie die von E. P. Pick³⁾ zum gleichen Zweck ausgearbeitete Fractionirung mit Ammonsulfat. Da der Bestimmung des Stickstoffs bei Anwendung von Zinksulfat kein Hinderniss entgegensteht, so bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, sich auf kurzem Wege über die Vertheilung des Eiweissstickstoffs auf die einzelnen Spaltungsprodukte zu orientiren und damit ein Maass für ihr quantitatives Auftreten im Verlauf der Pepsinverdauung zu gewinnen. Diese Aussicht veranlasste mich auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister planmässige Versuche in dieser Richtung durchzuführen.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, 1899, S. 219.

2) A. Bömer, Zinksulfat ein Fällungsmittel für Albumosen. Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. 34, S. 562. — K. Baumann und A. Bömer, Ueber die Fällung der Albumosen durch Zinksulfat. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel, Bd. I, 1898, S. 106.

3) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXIV, 1897. S. 246.

I. Methodisches.

Wie aus der Eingangs erwähnten Arbeit hervorgeht, lassen sich aus peptischen Verdauungslösungen durch Zusatz von Zinksulfat vier Albumosenfractionen gewinnen. Davon enthält die zuerst ausfallende das Gemenge der Proto- und Heteroalbumose (die «primären» Albumosen der Autoren); die zweite, dritte und vierte entsprechen den Deuteroalbumosen A, B und C von E. P. Pick; im Filtrat der vierten Fraction finden sich die «echten» Peptone.¹⁾ Meine wesentliche Aufgabe ging dahin, die Stickstoffmenge zu ermitteln, welche sich in den einzelnen durch Zinksulfat trennbaren Fractionen findet, und welche Veränderung sich in dieser Vertheilung des Stickstoffs im Laufe der Verdauung vollzieht. Es wäre wünschenswerth gewesen, die Menge der Hetero- und Protalbumose und auch des von E. P. Pick unterschiedenen A- und B-Peptons, genauer gesagt, des darin enthaltenen Stickstoffs getrennt zu bestimmen. Da jedoch die zur Isolirung dieser Stoffe vorhandenen Mittel nicht zu einer quantitativen Abscheidung führen, so musste ich vorläufig auf eine Vervollständigung meiner Befunde in dieser Richtung verzichten. Bemerkt sei weiter, dass ich auch auf die im Witte-Pepton in sehr geringer Menge enthaltene Deuteroalbumose A_α²⁾ nicht weiter Rücksicht nahm, da das Vorkommen derselben unter den Verdauungsprodukten der von mir untersuchten Eiweisskörper nicht erwiesen war.

Zunächst versuchte ich die Bestimmung des in den verschiedenen Fractionen vorhandenen Stickstoffs durch direkte Analyse der Niederschläge zu erreichen. Doch erwies sich

1) Da die ausschliessliche Bezeichnung von Proto- und Heteroalbumose als primärer Produkte nicht berechtigt ist, wie aus dem Späteren hervorgeht, habe ich das Attribut «primär», wo es bloss die genannten zwei Albumosen charakterisiren soll, durch Anführungszeichen hervorgehoben. Der Ausdruck «Pepton» ist in vorliegender Arbeit im Sinne Kühne's gebraucht, bezeichnet also die durch Salz nicht mehr fällbaren, aber noch die Biuretreaction gebenden Endprodukte der Verdauung.

2) E. Zunz, loc. cit., S. 239.

dies praktisch als kaum in grösserem Umfang durchführbar. Wegen der geringen Menge der erhaltenen Niederschläge ist man gezwungen, von grösseren Mengen Lösung auszugehen. Das Auswaschen der Niederschläge ist sehr zeitraubend. Die Flüssigkeitsmenge, die man dabei erhält, steigert sich mit jeder Fraction und erschwert, da Eindampfen ausgeschlossen ist, die Bestimmung sehr erheblich, abgesehen davon, dass die eingetretenen Volumänderungen immer wieder neue Volumbestimmungen und Umrechnungen nöthig machen.

Ich habe einige Vorversuche nach diesem Plan durchgeführt. Dabei habe ich die Niederschläge auf Filtern von vorher ermitteltem Stickstoffgehalt gesammelt, so dass Filter sammt Niederschlag zur Bestimmung nach Kjeldahl dienen konnten.

Viel bequemer jedoch und schneller kommt man zum Ziel, wenn man jedesmal den Unterschied zwischen dem Stickstoffgehalt der Verdauungsflüssigkeit vor und nach Abscheidung einer Albumosenfraction feststellt. Bei meinen Untersuchungen habe ich deswegen dieses Verfahren bevorzugt.

Als Ausgangsmaterial diente mir vor Allem krystallisiertes Serumalbumin, dargestellt nach Gürber,¹⁾ und Casein, bereitet nach Hammarsten,²⁾ das letztere von Merck in Darmstadt bezogen. Für ergänzende qualitative Untersuchungen benutzte ich ferner krystallisiertes Eialbumin, dargestellt nach Hofmeister,³⁾ und gereinigtes Serumglobulin.⁴⁾ Sämmtliche Eiweisskörper wurden durch Alkohol coagulirt, die Niederschläge zunächst mit kaltem, dann mit heissem Wasser so lange gewaschen, bis in den Waschwässern keine

1) Gürber, Krystallisation des Serumalbumins. Sitzungsber. d. physik.-med. Ges. z. Würzburg, 1894.

2) O. Hammarsten, Verhandlungen der kgl. schwed. Akad. der Wissenschaften, Upsala 1877.

3) F. Hofmeister, Ueber jodirtes Eialbumin. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, 1897, S. 159.

4) Vgl. W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens, Inaugural-Dissertation, Strassburg 1898.

Sulfatreaction mehr zu erhalten war,¹⁾ hierauf mit Alkohol, dann mit Aether gewaschen, bei Zimmertemperatur getrocknet und feinst gepulvert. Die Vorversuche, die zur Ausmittlung eines zweckentsprechenden Verfahrens nöthig waren, habe ich mit Witte-Pepton ausgeführt.

Als Verdauungsflüssigkeit verwandte ich eine 0,3 %ige Salzsäurelösung, welcher auf 500 ccm. Flüssigkeit 20 cg Pepsinum purissimum von Grübler²⁾ zugesetzt wurden. Die Salzsäure und die verschiedenen den Flüssigkeiten beizuzumengenden Lösungen, wie Pepsinlösung, Natronlauge, Schwefelsäure, Zinksulfat, prüfte ich stets mit Nessler's Reagens auf Abwesenheit jeglicher Spur von Ammoniak.

Bei den quantitativ durchgeführten Versuchen wurde der Einfachheit wegen die Verarbeitung der Verdauungslösungen stets erst nach Verschwinden des Anfangs entstehenden Acidalbumins begonnen. Das Acidalbumin wird schon durch eine geringe Menge der gesättigten Zinksulfatlösung gefällt. In meinen Versuchen hätte es sich der ersten Fraction beigemengt und für diese einen zu grossen Stickstoffgehalt ergeben.

Der Procentgehalt einer Verdauungsprobe bleibt, guten Verschluss vorausgesetzt, während der ganzen Dauer des Verdauungsprocesses unverändert. Um den Gesamtstickstoffgehalt der Flüssigkeit zu bestimmen, genügt es daher, das Mittel mehrerer in einem beliebigen Stadium der Verdauung nach Kjeldahl ausgeführten Bestimmungen zu nehmen. Die für 10 ccm. ermittelte Zahl setzte ich gleich 100 %. Für die Berechnung des Procentsatzes des in den verschiedenen Fractionen enthaltenen Stickstoffes habe ich dann stets das Resultat der Analysen auf 10 ccm. der ursprünglichen Lösung umgerechnet.

Behufs Bestimmung des Stickstoffs in den einzelnen Fractionen habe ich nachstehenden Weg eingeschlagen. In dem

1) Dies wurde nur durch wochenlanges Waschen erreicht (besonders spät beim Serumglobulin), während die Abwesenheit von Ammoniak durch Nessler's Reagens schon nach einigen Tagen nachweisbar war.

2) Dieses Präparat erwies sich als sehr stark wirksam.

in Aussicht genommenen Zeitpunkte der Verdauung entnimmt man der Verdauungsprobe eine genau gemessene Menge Flüssigkeit, neutralisirt dieselbe sorgfältig durch tropfenweise Zufügung einer verdünnten Natronlauge und säuert sie hierauf durch Zusatz von 2 ccm. verdünnter Schwefelsäure (1 Volumen concentrirter Schwefelsäure auf 4 Volumina Wasser) auf je 100 ccm. Flüssigkeit an. Das Gesamtvolum der Flüssigkeit wird notirt, um festzustellen, in welchem Verhältnisse dasselbe zu 10 ccm. der ursprünglichen Verdauungsflüssigkeit steht. Hierauf fügt man das gleiche Volumen einer kaltgesättigten und in gleichem Maasse mit Schwefelsäure angesäuerten Zinksulfatlösung hinzu. Die «primären» Albumosen werden auf diese Weise in Gestalt feiner Flocken gefällt, welche sich ziemlich schnell auf den Boden des die Flüssigkeit enthaltenden Gefässes absetzen. Um absolut klare und von «primären» Albumosen völlig freie Filtrate zu erzielen, ist es gut, die Flüssigkeit einige Tage an einem kühlen Orte stehen zu lassen. Für die folgenden Fractionen (Deuteroalbumosen) ist diese Vorsichtsmassregel noch mehr erforderlich, da bei ihnen die Abscheidung eines abfiltrirbaren Niederschlags häufig erst nach längerem Stehen erfolgt.

Das Filtriren darf erst dann beginnen, wenn der Niederschlag sich vollständig oder wenigstens zum grössten Theil am Boden des Gefässes abgesetzt hat. Um dem Verlust von Flüssigkeit durch Verdunstung vorzubeugen, empfiehlt es sich, die Filtration an einem kühlen Orte vorzunehmen. Der Trichter mit dem doppelten oder dreifachen Filter steht unmittelbar in dem die filtrirende Flüssigkeit aufnehmenden Kolben und wird sorgfältig mit einer Glasplatte bedeckt gehalten. Vom klaren Filtrat (Filtrat α) wird nun so viel Flüssigkeit abgemessen, als 10 ccm. der Ursprungslösung entspricht, und dann der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der Unterschied zwischen dem Gesamtstickstoff der ursprünglichen Lösung und dem Stickstoffgehalt des Filtrats α ergibt den in den «primären» Albumosen enthaltenen Stickstoff.

Zum Filtrat α setzt man die zur Fällung der zweiten Fraction nöthige Menge Zinksulfat hinzu. Für Serumalbumin

und Casein muss die Ursprungslösung zu $\frac{2}{3}$ gesättigt werden. Dies wird erreicht, indem man dem Filtrat α die Hälfte seines Volumens an gesättigter saurer Zinksulfatlösung hinzufügt. Nach genügendem Stehen und nach vorsichtigem, wie oben vorgenommenem Filtriren bestimmt man nach Kjeldahl den Stickstoffgehalt eines 10 ccm. der Ursprungslösung entsprechenden Theiles des neuen Filtrats (Filtrat β). Der Unterschied zwischen Filtrat α und β ergibt den Stickstoff der in 10 ccm. enthaltenen Deuteroalbumose A.

Dem Filtrat β wird nun die zur Ausscheidung der Fraction III (Deuteroalbumose B) genügende Menge gesättigter angesäuerter Zinksulfatlösung zugesetzt. Beim krystallisirten Serumalbumin und Casein muss dem Filtrat β eine den $\frac{4}{5}$ seines Volumens entsprechende Menge von Zinksulfatlösung zugesetzt werden, wodurch eine $\frac{6}{7}$ gesättigte Flüssigkeit entsteht. Subtrahirt man den Stickstoffgehalt eines Volumens des nach oben angeführten Regeln erhaltenen neuen Filtrats γ , welches 10 ccm. der ursprünglichen Lösung gleichkommt, von dem entsprechenden Volumen des Filtrats β , so erhält man den Stickstoffgehalt der Deuteroalbumose B.

Zur Fällung der Fraction IV (Deuteroalbumose C) wird das Filtrat γ mit reinstem krystallisirten feingepulverten Zinksulfat gesättigt. Damit sich das Salz vollständig auflöst, wird die gesättigte Flüssigkeit während zwei bis drei Stunden einer Temperatur von circa 40° ausgesetzt und dann an einem kalten Orte stehen gelassen. Nach vollständiger Sättigung der Flüssigkeit scheidet sich der Ueberschuss an Zinksulfat sehr schnell in Gestalt schöner Krystalle ab. Das Volumen der Lösung muss vor dem Eintragen des Zinksulfats wie auch nach erreichter Sättigung genau bestimmt werden. Beide Bestimmungen sind nöthig, um bei den Analysenberechnungen die geringe, durch Zusatz des Zinksulfats bewirkte Volumsteigerung des Filtrats γ berücksichtigen zu können. Der Unterschied zwischen dem Stickstoffgehalt des neuen, mit Zinksulfat gesättigten Filtrats δ und demjenigen des Filtrats γ ergibt den Stickstoffgehalt der Fraction IV (Deuteroalbumose C).

Die zunehmende Verdünnung der aufeinanderfolgenden

Filtrate sowie die fortschreitende, durch Ausfällen der Albumosen bedingte Abnahme an Stickstoffgehalt macht bei den Stickstoffbestimmungen für die späteren Filtrate die Verwendung einer entsprechend zunehmenden (bis zu 100 ccm. ansteigenden) Flüssigkeitsmenge erforderlich. Es ist daher nöthig, die Proben der Filtrate α , β , γ und δ zunächst im Wasserbad auf ein geringeres Volumen einzudampfen und dann erst nach dem Erkalten mit der Kjeldahl-Schwefelsäure zu versetzen. Die Gegenwart grösserer Mengen Zinksulfat hat den Nachtheil, die Oxydation etwas zu verlangsamen.

Ein kleiner Fehler wird anscheinend bei meinem Vorgehen dadurch eingeführt, dass das allerdings sehr geringe Volumen der verschiedenen Niederschläge gleich Null gesetzt wird. Nun ist aber das Volumen der Niederschläge, wenn man das imbibirte Wasser in Abzug bringt, dem Gesamtvolumen der Flüssigkeit gegenüber stets ein so geringes, dass der aus seiner Vernachlässigung hervorgehende Fehler in der Regel nur einige Tausendstel oder höchstens einige Hundertstel Procent erreicht und jedenfalls kleiner ist, als der Fehler, der sich aus den Schwierigkeiten, die Niederschläge völlig auszuwaschen, ergibt.

Als eine ernstlicher ins Auge zu fassende Fehlerquelle muss hingegen das oftmalige Abmessen kleiner Flüssigkeitsmengen angesehen werden, da die Abmessungsfehler bei der Berechnung der Stickstoffwerthe eine erhebliche Multiplication erfahren. Selbstverständlich ist der so entstandene Fehler bedeutender für die letzten Fractionen, als für die ersten. Ich habe ihn durch sorgfältiges Arbeiten und zahlreiche Kontrollanalysen auszumerzen gesucht. Jedenfalls habe ich eine sehr gute Uebereinstimmung meiner Analysen erreicht. Der Unterschied zwischen zwei Analysen des gleichen Filtrats betrug im Durchschnitt aus allen Vergleichsversuchen 0,367% (Max. = 0,876, Min. = 0,025) vom Gesamtstickstoff (dieser gleich 100 angenommen). Er muss mit den Fehlerquellen wachsen und wurde daher bei den Endfiltraten etwas grösser gefunden. Er betrug in den aufeinanderfolgenden Filtraten α , β , γ und δ 0,310, 0,189, 0,375, 0,561 % des Gesamtstickstoffes.

II. Versuche mit krystallisiertem Serumalbumin.

A. Die Albumosen.

20 g reines trockenes krystallisiertes Serumalbumin wurden in etwa 1500 ccm. Verdauungsflüssigkeit vertheilt. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunden ist das Serumalbumin bereits vollständig gelöst und nach zweistündiger Verdauung erhält man kein Neutralisationspräcipitat mehr. Von der Verdauungsflüssigkeit entnahm ich nach 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden Verdauungszeit genau 250 ccm. und untersuchte nach oben geschildertem Verfahren die Vertheilung des Stickstoffes auf die verschiedenen Albumosen. Um die angewandte Methodik zu veranschaulichen, gebe ich in nachstehender Tabelle die Ergebnisse des Einzelversuches, bei welchem die Verdauung nach 2 Stunden unterbrochen worden war.

Der Gesamtstickstoffgehalt in 10 ccm. Serumalbuminlösung ergab sich bei vier zu verschiedenen Zeitpunkten der Verdauung ausgeführten Analysen zu

$$\left. \begin{array}{l} 0,01967 \text{ g} \\ 0,01975 \text{ g} \\ 0,01978 \text{ g} \\ 0,01983 \text{ g} \end{array} \right\} \text{ also im Mittel } 0,01976 \text{ g.}$$

Tabelle I. (Nach zweistündiger Verdauung.)

Analysirte Lösung		Menge der Lösung ccm.	Gefunden N g	N auf 10 ccm. der ursprünglichen Lösung berechnet. ¹⁾ g	% N
Filtrat α	Analyse I	40	0,03101	0,016179	81,88
	Analyse II	40	0,03115	0,016252	82,25
	im Mittel	—	—	0,016216	82,06
Filtrat β	Analyse I	50	0,02463	0,015421	78,04
	Analyse II	50	0,02464	0,015427	78,07
	im Mittel	—	—	0,015424	78,06
Filtrat γ	Analyse I	100	0,01761	0,012866	65,11
	Analyse II	100	0,01763	0,012875	65,16
	im Mittel	—	—	0,012871	65,14

¹⁾ Je $20^{00}/_{33}$, $31^{17}/_{33}$, $73^{11}/_{33}$ $78^{11}/_{10}$ ccm. der Filtrate α , β , γ , δ entsprechen genau 10 ccm. der ursprünglichen Serumalbuminlösung.

Analysirte Lösung	Menge der Lösung ccm.	Gefunden N g	N auf 10 ccm. der ursprünglichen Lösung berechnet. g	% N	
Filtrat δ {	Analyse I	100	0,01603	0,012520	63,36
	Analyse II	100	0,01610	0,012574	63,63
	im Mittel	—	—	0,012547	63,50

Aus dieser Tabelle (I) geht hervor, dass nach zweistündiger Verdauung die Lösung enthielt 100,00—82,06, also 17,94 % des Gesamtstickstoffes in den «primären» Albumosen, 82,06—78,06, also 4,00 % in der Deuteroalbumose A, 78,06—65,14, also 12,92 % in der Deuteroalbumose B, 65,14—63,50, also 1,64 % in der Deuteroalbumose C, also im Ganzen nur 36,50 % in den Albumosen überhaupt.

Um die Darstellung meiner Versuche nicht mehr wie nöthig auszudehnen, sollen in folgender Tabelle (II) die mit den anderen untersuchten Flüssigkeiten erzielten Ergebnisse nur in Procenten des Gesamtstickstoffes wiedergegeben werden.

Tabelle II.

Analysirte Lösung		% N		
		Analyse I	Analyse II	im Mittel
Nach 4stündiger Verdauung	Filtrat α	92,79	93,17	92,98
	» β	83,81	84,20	84,01
	» γ	75,26	75,60	75,43
	» δ	73,78	74,32	74,05
Nach 8stündiger Verdauung	Filtrat α	98,58	99,15	98,87
	» β	92,67	92,97	92,82
	» γ	77,03	77,55	77,29
	» δ	75,67	76,52	76,09
Nach 24stündiger Verdauung	Filtrat α	98,86	98,90	98,88
	» β	95,16	95,19	95,17
	» γ	90,30	91,11	90,70
	» δ	86,92	87,44	87,18

Analysirte Lösung		% N		
		Analyse I	Analyse II	im Mittel
Nach 48 stündiger Verdauung	Filtrat α	99,20	99,40	99,30
	„ β ¹⁾	—	—	—
	„ γ	98,05	98,18	98,11
	„ δ	90,68	91,55	91,11
Nach 72 stündiger Verdauung	Filtrat α	99,36	99,56	99,46
	„ β	—	—	—
	„ γ	98,96	99,16	99,06
	„ δ	92,89	93,49	93,19

Wenn die Zahlen der letzten Columnne der Tabelle II, welche, wie in der Tabelle I dargelegt, den Stickstoffgehalt der verschiedenen Filtrate anzeigen, von einander in Abzug gebracht werden, so erhält man die den verschiedenen Albumosen in den einzelnen Phasen der Serumalbuminverdauung zugehörigen Stickstoffmengen.

Tabelle III.

Ver- dauungs- zeit	% N enthalten in					
	den «primären» Albumosen	der Deutero- albumose A	der Deutero- albumose B	der Deutero- albumose C	den gesamten Albumosen	den anderen Verdauungs- produkten
2 Stunden	17,94	4,00	12,92	1,64	36,50	63,50
4 „	7,02	8,97	8,58	1,38	25,95	74,05
8 „	1,13	6,05	15,53	1,20	23,91	76,09
24 „	1,12	3,71	4,47	3,52	12,82	87,18
48 „	0,70	0,00	1,19	7,00	8,89	91,11
72 „	0,54	0,00	0,40	5,87	6,81	93,19

Aus dieser Tabelle, besser noch aus der graphischen Darstellung in Tafel I lässt sich Zu- und Abnahme der einzelnen Fractionen, ausgedrückt durch ihren Stickstoffgehalt, ohne Weiteres entnehmen.

1) Es findet sich keine Spur von Deuteroalbumose A mehr; man muss das Filtrat α zu $\frac{6}{7}$ sättigen, um eine neue Trübung, die von der Fällung der Deuteroalbumose B herrührt, zu erzielen.

Die nach zweistündiger Verdauung verhältnissmässig in grosser Menge vorhandenen «primären» Albumosen nehmen bis gegen die achte Stunde schnell, hierauf sehr langsam ab und sind am dritten Tage des Verdauungsprocesses nur noch in geringer Menge vorhanden.¹⁾

Die Deuteroalbumose A ist nach zweistündiger Verdauung noch im schnellen Zunehmen begriffen und erreicht ihr Maximum nach vierstündiger Verdauung, dann tritt ein fast ebenso schnelles Absinken ein, das vor Ablauf von 48 Stunden zum völligen Verschwinden führt.

Die Deuteroalbumose B ist hingegen schon in der zweiten Stunde verhältnissmässig reichlich vorhanden, zeigt dann in der vierten Stunde bedeutende Abnahme, erreicht aber in der achten Stunde ein zweites Maximum. Dann nimmt ihre Menge bis zur 24. Stunde zuerst rasch, später langsam ab. Nach 3 tägiger Verdauung ist der zurückgebliebene Rest, wie auch bei den «primären» Albumosen, verschwindend gering.

Die Deuteroalbumose C ist in der 2. Stunde des Versuches in kleiner Menge vorhanden und bleibt der Menge nach ziemlich lange unverändert (die geringe Verminderung, welche nach 4- und 8stündiger Verdauung eintritt, überschreitet die Fehlergrenzen nicht); nach 24 Stunden erreicht sie ihr Maximum, sinkt dann sehr langsam ab und bleibt in verhältnissmässig grosser Menge bis zum Ende des Versuchs nachweisbar.

Zu beachten ist das Nichtzusammenfallen der den verschiedenen Fractionen zukommenden Maxima. Auch sind dieselben weit stärker bei den «primären» Albumosen und der Deuteroalbumose B ausgesprochen, als bei den Deuteroalbumosen A und C. Ein Blick auf Taf. I zeigt, dass man je nach dem Zeitpunkt, in welchem man die Verdauung unterbricht, sehr verschiedene Combinationen in der Vertheilung des Stickstoffes zwischen den verschiedenen Albumosen erreichen kann. Nach 2stündiger Verdauung gehört z. B. der grösste

¹⁾ Am Anfange waren vielleicht noch Spuren von Acidalbumin, die nur durch Einengen und Kochen zu beseitigen gewesen wären, in den Verdauungsflüssigkeiten vorhanden. Möglicher Weise ist sonach der für «primäre» Albumosen erhaltene Werth etwas zu hoch ausgefallen.

Theil des Albumosenstickstoffes den «primären» Albumosen, der geringste der Deuteroalbumose C an. Nach 4 Stunden zeigt sich letztere kaum vermehrt, hingegen findet sich ein Maximum bei Deuteroalbumose A. Nach 8 Stunden findet ein neuer Wechsel statt: Maximum und Minimum befinden sich in den Fractionen III und I (Deuteroalbumose B und «primäre» Albumosen), und so weiter.

Hieraus folgt, dass Bestimmungen der Verdauungsprodukte in einem willkürlich gewählten Zeitpunkte der Verdauung unmöglich eine Vorstellung über den Verlauf des Verdauungsvorgangs vermitteln können, und es erklärt sich von selbst, dass die Untersuchung käuflicher Verdauungspräparate meist nicht zu übereinstimmenden Zahlen führt. So ist z. B. Witte-Pepton von sehr wechselnder Zusammensetzung, was schon Neumeister¹⁾ hervorgehoben hat. Ich halte es deswegen für überflüssig, die in meinen Vorversuchen ermittelten Werthe eingehender mitzutheilen. Aus meinen Versuchsreihen (5 an der Zahl) geht hervor, dass vom Gesamtstickstoff des Witte-Peptons 20,06 bis 36,09% in den «primären» Albumosen, 4,02 bis 6,20% in der Deuteroalbumose A, 2,79 bis 11,46% in der Deuteroalbumose B, 10,10 bis 28,73% in der Deuteroalbumose C, im Ganzen 47,02 bis 69,33% in den Albumosen überhaupt vorhanden sind, während der Rest des Stickstoffs zum Theil auf Pepton, zum Theil auf andere stickstoffhaltige Substanzen entfällt. Diese Schwankungen sind ohne Zweifel zum grössten Theil davon abhängig, dass bei der Bereitung dieses Fabrikpräparats die Verdauung des Fibrins nicht in dem gleichen Stadium unterbrochen wird.

Ich erlaube mir ferner noch auf die rasche Abnahme des im Gesamtbestande der Albumosen enthaltenen Stickstoffes hinzuweisen; sie erfolgt um so langsamer, je länger die Verdauung gedauert hat. Nach zweistündiger Verdauung findet man in der Versuchsreihe der Tabelle III nicht viel mehr als ein Drittel des Gesamtstickstoffes in Gestalt von Albumosen.

¹⁾ R. Neumeister, Zur Kenntniss der Albumosen. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 5, 1887, S. 381.

B. Die Peptone.

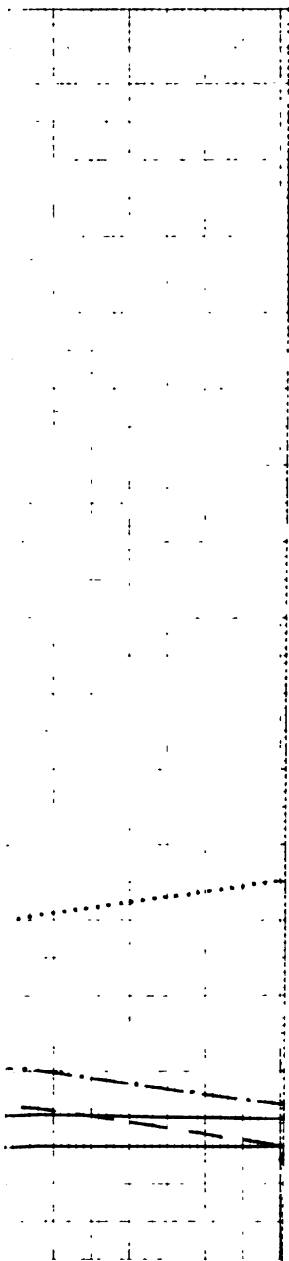
Interessant war es, zu wissen, in welchem Umfang die übrig bleibende stickstoffhaltige Substanz in Form von «Pepton», das heisst nicht durch Salz fällbarer, aber die Biuretreaction darbietender Produkte vorhanden war. Leider gibt es noch keine für den vorliegenden Fall brauchbare Methode, welche die getrennte vollständige Abscheidung der Peptone ermöglicht.

Das am häufigsten zur Fällung der Peptone benutzte Reagens, die Phosphorwolframsäure, ist zwar, wie Baumann und Bömer¹⁾ gezeigt haben, auch auf zinkhaltige Lösungen anwendbar. Allein einerseits fehlt der Nachweis, dass die Fällung der Peptone durch dieses Fällungsmittel eine vollständige ist (Neumeister²⁾ bestreitet dies sogar ganz entschieden), andererseits liegt die Möglichkeit vor, dass neben Pepton andere Spaltungsprodukte, z. B. Diaminosäuren, mitgefällt werden. Das erstangeführte Bedenken liess sich in meinen Versuchen leicht durch den Nachweis entkräften, dass in meinen Flüssigkeiten nach Ausfällung mit Phosphorwolframsäure jede Biuretreaction ausblieb. Hingegen konnte ich das zweite Bedenken nicht beseitigen, ja es fand in meinen Versuchen gewichtige neue Stützen.

Die Bestimmung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs lässt sich in nachstehender Weise durchführen. Dem nach vollständiger Fällung der Albumosen erhaltenen Filtrat *b* (siehe Tabellen I und II) wird, nach dem Beispiele von Baumann und Bömer, die Hälfte seines Volumens an verdünnter Schwefelsäure (1 Volumen concentrirte Schwefelsäure, 4 Volumina Wasser) und dann eine genügende Menge wässriger Lösung von Phosphorwolframsäure hinzugefügt. Die hierdurch erhaltene trübe Flüssigkeit lässt man erst 4 bis 6 Stunden bei einer Temperatur von 40°, hierauf ein bis zwei Tage an einem Ort bei niedriger Temperatur stehen, worauf mit üblicher Vorsicht filtrirt werden kann. Das klare Filtrat (Filtrat *c*) ist blassviolett gefärbt und trübt sich nicht mehr auf Zusatz eines Tropfens der Phosphorwolframsäurelösung. Selbstverständlich muss das Volumen des Filtrats *b* vor und nach Zugabe der

1) K. Baumann und A. Bömer, l. c.

2) R. Neumeister, Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. VIII, 1890, S. 340.



verdünnten Schwefelsäure und der Phosphorwolframsäure festgestellt werden. Der Stickstoffgehalt des Filtrats ϵ wird nun nach Kjeldahl bestimmt. Wie Hausmann¹⁾ mit Recht bemerkt, wird die Oxydation der zu analysirenden Flüssigkeiten durch die Anwesenheit von Phosphorwolframsäure ziemlich erschwert. Seinem Beispiel folgend vollführte ich die Oxydation in Literflaschen aus Jenaer Glas, welche später zugleich zum Abdestilliren dienten. Die zu untersuchende Flüssigkeit (in der Regel 250 ccm.) wird zuerst auf ein geringes Volumen eingeeengt, dann mit einer grossen Menge Kjeldahl-Schwefelsäure vermischt, bis zur Schwarzfärbung erhitzt, erkalten gelassen, dann mit etwas übermangansaurem Kali versetzt und nach 24stündigem Stehen neuerlich 8 bis 10 Stunden erhitzt. Nach Beendigung der Oxydation enthält die Probe einen reichlichen gelben Niederschlag (Wolframtrioxyd). Das Abdestilliren und Titriren geschieht in üblicher Weise. Wegen der geringen Menge der nach Bestimmung des Stickstoffes übrigbleibenden Flüssigkeit δ war es mir unmöglich, in allen Fällen so viel vom Filtrat ϵ zu erhalten, dass ich mehr als eine Analyse hätte vornehmen können. Tabelle IV enthält die ermittelten Ergebnisse.

Tabelle IV.

Verdauungs- zeit	N des Filtrats ϵ in Procent des Gesamt-N		
	Analyse I	Analyse II	im Mittel
2 Stunden	61,14	—	—
4 „	62,47	—	—
8 „	55,70	—	—
48 „	54,40	54,69	54,54
72 „	33,91	35,69	34,80

Durch Subtraction dieser Werthe von den im Filtrat δ gefundenen, erhält man die im Phosphorwolframsäureniederschlag verbliebene Stickstoffmenge. Der besseren Uebersicht wegen ist in folgender Tabelle (V) der Stickstoffgehalt der Albumosen, der durch Phosphorwolframsäure ausgefällten Körper und der letzten Filtrate (ϵ) nebeneinander gestellt.

¹⁾ W. Hausmann, Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVII, 1899, S. 99.

Tabelle V.

Verdauungs- zeit	Von 100 N des Serumalbumins ist		
	durch Zinksulfat fällbar (Albumosen)	durch Phosphor- wolframsäure fällbar (Peptone, u. s. w.)	weder durch Zink- sulfat noch durch Phosphorwolfram- säure fällbar
	o/o	o/o	o/o
2 Stunden	36,50	2,36	61,14
4 „	25,95	11,58	62,47
8 „	23,91	20,39	55,70
24 „	12,82	—	—
48 „	8,89	36,57	54,54
72 „	6,81	58,39	34,80

Aus dieser Tabelle ersieht man mehrere auffallende That-
sachen: Während die durch Phosphorwolframsäure fällbare,
im Beginn des Verdauungsprocesses sehr geringe Stickstoff-
menge rasch zunimmt und nach dreitägiger Verdauung beinahe
 $\frac{3}{5}$ des Gesamtstickstoffs des Serumalbumins beträgt, bleibt
die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoffmenge,
die schon nach zweistündiger Verdauung mehr als $\frac{3}{5}$ des
Gesamtstickstoffs entspricht, zuerst unverändert, nimmt dann
aber zwischen der 4. und 8. Stunde des Verdauungsprocesses
ab und sinkt schliesslich nach 72 Stunden nahezu auf $\frac{1}{3}$ des
Gesamtstickstoffs herab.

Nach zweistündiger Verdauung ist sonach in meinem
Versuche sicher nur wenig Pepton entstanden, und mehr als
die Hälfte des gesammten Eiweissstickstoffs findet sich in
Biuretreaction nicht gebenden Substanzen. Später erfolgt zwar
augenscheinlich eine Vermehrung der Peptone durch Neu-
bildung aus den vorhandenen Albumosen, doch lässt sich nicht
feststellen, in welchem Umfang das geschieht. Der Vergleich
der in den Columnen 3 und 4 der Tabelle V angeführten Werthe
zeigt nämlich, dass die Zunahme des durch Phosphorwolfram-
säure fällbaren Stickstoffs von der 48. Stunde ab zum grössten
Theile auf eine Umwandlung der nicht albumosen- oder pepton-

artigen Stoffe in durch Phosphorwolframsäure fällbare Produkte zu beziehen ist. Nach den gefundenen Zahlen lässt sich im besten Fall die Menge des in Form von Pepton vorhandenen Stickstoffs auf etwa 30% des Gesamtstickstoffs veranschlagen.

Wenn, nach sorgfältiger Ausfällung des im Filtrat ε enthaltenen Zinks durch tropfenweise zugesetzte Natronlauge, der Flüssigkeit vorsichtig Gerbsäurelösung zugefügt wird, erhält man einen Niederschlag, welcher sich in einem Ueberschuss des Reagens wieder auflöst. Eine mit Zinksulfat gesättigte Jodjodkaliumlösung erzeugt ebenfalls im Filtrat ε ausgesprochene Trübung.

Ein sehr erheblicher Theil der die Biuretreaction nicht gebenden Verdauungsprodukte ist also durch Alkaloidreagentien fällbar. Angesichts dieser Thatsache liegt die Frage nahe, ob sich diese die Biuretreaction nicht gebenden Körper bereits bei Beginn des Verdauungsprocesses in beträchtlichem Maasse bilden oder erst secundär aus den die Biuretreaction gebenden Verdauungsprodukten (Albumosen und Peptonen) entstehen.

Um diese Frage zu beantworten, habe ich meine Versuche in der Art ergänzt, dass ich coagulirtes Serumalbumin $\frac{1}{2}$, 1 und 2 Stunden der Verdauung unterwarf, dann mit Zinksulfat in oben beschriebener Weise ausfällte und einerseits den Stickstoffgehalt der Flüssigkeit vor und nach der Fällung verglich, andererseits das albumosenfreie Filtrat mittelst der Biuretprobe auf Pepton untersuchte.

Bereits nach einer halben Stunde war der grösste Theil des Serumalbumins in Lösung gegangen. Doch war noch nach 2 Stunden in der Verdauungsflüssigkeit ein geringer ungelöster Rest vorhanden, wahrscheinlich weil diesmal mehr Serumalbumin auf die gleiche Flüssigkeitsmenge genommen worden war, als im ersten Versuche.

Nach Entfernung des ungelösten Serumalbumins durch Filtriren bestimmte ich den Stickstoffgehalt in 10 ccm. Lösung. Die Verdauungsflüssigkeit wurde dann mit verdünnter Natronlauge sorgfältig neutralisirt, hierauf, wie gewöhnlich, mit Schwefelsäure angesäuert, schliesslich mit feingepulvertem reinen krystallisirten Zinksulfat gesättigt. Nach genügendem Stehenlassen wurde filtrirt und der Stickstoffgehalt in einer 10 ccm. der ursprünglichen Serumalbuminlösung entsprechenden Menge Filtrat bestimmt. In folgender Tabelle sind die ermittelten Werthe zusammengefasst.

Tabelle VI.

Verdauungszeit	% N enthalten in		Biuretreaction im albumosen- freien Filtrat
	dem Acidalbumin und den Albumosen	den anderen Ver- dauungsprodukten	
$\frac{1}{2}$ Stunde	69,02	30,98	negativ
1 „	71,05	28,95	negativ
2 „	61,60	38,40	schwach positiv

Die Menge des nach einstündiger Verdauung erhaltenen Neutralisationspräcipitates war etwas grösser als diejenige, welche mit der nach einer halben Stunde gewonnenen Verdauungsflüssigkeit erhalten wurde. Nach 2stündiger Verdauung gab die Flüssigkeit nur noch ein sehr geringes Neutralisationspräcipitat; der gefundene Stickstoffwerth der 2. Columne entspricht somit annähernd dem Albumosenstickstoff. Peptone waren nur in der Probe mit zweistündiger Verdauungszeit vorhanden, während sich die Biuretreaction nicht darbietende Produkte schon nach halbstündiger Digestion reichlich (gegen 30% des Gesamtstickstoffs) finden. Man sieht sonach, dass sehr bald nach Beginn der peptischen Spaltung in bedeutender Menge Verdauungsprodukte auftreten können, denen die Biuretreaction fehlt. Die betreffenden, nach Fällung der Albumosen gewonnenen Filtrate gaben, nachdem sie von ihrem Zinkgehalt befreit worden waren, mit Gerbsäure einen flockigen Niederschlag, welcher sich in einem Ueberschuss des Reagens wieder auflöste.

Man bemerkt, dass die Menge der nach 2stündiger Verdauung gewonnenen, durch Zinksulfat nicht fällbaren Verdauungsprodukte in der Tabelle VI viel geringer ausgefallen ist als in der ersten Versuchsreihe (Tabellen I bis V). Der Grund liegt auch hier wahrscheinlich in der Verwendung einer relativ grösseren (beinahe doppelten) Eiweissmenge und einem entsprechend langsameren Verlauf der Verdauung.

C. Das zeitliche Auftreten und Verschwinden der einzelnen Produkte.

Um das zeitliche Auftreten der Verdauungsprodukte des Serumalbumins genauer zu bestimmen, habe ich eine 2,1 g

in 100 cc. enthaltende Probe mehrere Tage hindurch der Verdauung unterworfen, davon in bestimmten Intervallen kleinere Antheile entnommen und qualitativ auf die Anwesenheit der Albumosenfractionen geprüft. Jede Probe wurde sorgfältig mit verdünnter Natronlauge neutralisirt und, falls ein Niederschlag von Acidalbumin entstand, durch Filtriren davon getrennt. Nun wurde die neutrale Flüssigkeit wie in den früheren Versuchen angesäuert, dann auf « primäre » Albumosen durch Zusatz eines gleichen Volumens gesättigter angesäuerter Zinksulfatlösung, das Filtrat davon auf Deuteroalbumose A durch Zusatz eines halben Volumens, das Filtrat hiervon auf Deuteroalbumose B durch Zusatz von $\frac{1}{3}$ des Volumens der gleichen Lösung, endlich das letzte Filtrat auf Deuteroalbumose C durch Sättigung mit feingepulvertem, reinstem krystallisirten Zinksulfat geprüft. Im Filtrat von C wurde mit Hilfe der Biuretreaction auf Pepton gefahndet. Das Ergebniss der Versuchsreihe ist in Tabelle VII zusammengefasst. Da die unter Einhaltung gleicher äusserer Bedingungen erhaltenen Niederschläge oder Trübungen direkt mit einander verglichen werden konnten, so war unschwer für jede Fraction der Zeitpunkt zu bestimmen, in welchem sie in grösster Menge vorhanden war. Die betreffenden Proben sind in der Tabelle als Maxima (Max.) hervorgehoben.

Tabelle VII.

Verdauungszeit	Neutralisationspräcipitat (Acidalbumin)	« Primäre » Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
$\frac{1}{8}$ Stunde	Positiv	Spuren	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ
1 „	» (Max.)	Positiv	Spuren	»	Spuren	Spuren
$1\frac{1}{2}$ „	»	»	Positiv	»	Positiv	Positiv
2 Stunden	Negativ	» (Max.)	» (Max.)	» (Max.)	»	»
1 Tag	»	»	»	»	»	»
2 Tage	»	»	Spuren	»	»	»
3 „	»	Spuren	Negativ	Spuren	» (Max.)	»
4 „	»	Negativ	»	»	»	»
5 „	»	»	»	Negativ	»	»
6 „	»	»	»	»	»	»
7 „	»	»	»	»	Spuren	»
8—16 Tage	»	»	»	»	»	»

Das Serumalbumin war nach 2 Stunden vollständig gelöst.

Wie man sieht, ist schon $\frac{1}{2}$ Stunde nach Beginn der Verdauung die Gegenwart von Acidalbumin, «primären» Albumosen und Deuteroalbumosen A und B nachweisbar. Deuteroalbumose B tritt dabei sofort in fast ebenso grosser Menge auf wie das Acidalbumin, hingegen ist nur wenig Deuteroalbumose A und nur eine Spur von «primären» Albumosen zu finden. Deuteroalbumose C und Peptone fehlen. Das Filtrat von B, von seinem Zinkgehalt befreit, gibt nach Zutropfen von Gerbsäure einen Niederschlag von die Biuretreaction nicht gebenden Verdauungsprodukten. Nach einstündiger Verdauung zeigt sich bei dem Acidalbumin, den «primären» Albumosen und der Deuteroalbumose B merkliche Zunahme, während nur noch Spuren von Deuteroalbumose A zu finden sind. Das Acidalbumin überwiegt bei Weitem, dann kommt Deuteroalbumose B; von Deuteroalbumose C und Peptonen sind nur Spuren vorhanden. Das Acidalbumin, welches nach einstündiger Verdauung das Maximum erreicht hat, ist nach der zweiten Verdauungsstunde schon verschwunden, jedenfalls kommt nach diesem Zeitpunkt ein Neutralisationspräcipitat nicht mehr zu Stande. Die Deuteroalbumose A, von der nach einer Stunde nur noch Spuren übrig geblieben sind, erscheint dann vermehrt, erreicht ihr Maximum vor Ablauf des ersten Tages und verschwindet vollständig zwischen dem zweiten und dritten Tag. (Im früheren Versuche, in welchem ein geringerer Eiweissgehalt gewählt war, verschwand die Deuteroalbumose A sogar vor Ablauf des zweiten Tages.) Vielleicht gibt es bei der Deuteroalbumose A wie bei der Deuteroalbumose B (vergl. Tabelle III) zwei Maxima. Die «primären» Albumosen verschwinden zwischen dem dritten und vierten, die Deuteroalbumose B zwischen dem vierten und fünften Tag. Die Deuteroalbumose C und die Peptone, die, wie oben ersichtlich, erst nach einstündiger Verdauung erscheinen, finden sich noch am Schlusse einer 16tägigen Verdauungsperiode; sie müssen also als Endprodukte der Serumalbuminverdauung angesehen werden, abgesehen von den die Biuretreaction nicht gebenden stickstoffhaltigen Körpern. In vorstehender Versuchsreihe

(Tabelle VII) wurde die grösste Menge von Deuteroalbumose C am dritten, in der ersten Versuchsreihe (Tabelle III) am zweiten Tag beobachtet. Nach dem 7. Tag fanden sich nur noch Spuren von C vor, welche aber an den folgenden Tagen unvermindert blieben.

D. Bildung von Amidstickstoff.

Endlich habe ich untersucht, ob während der peptischen Verdauung des Serumalbumins Ammoniak oder ein Ammoniak leicht abspaltendes Produkt auftritt. Zu diesem Zweck wurde Serumalbumin der Verdauung in einer Pepsin-Salzsäurelösung unterworfen, deren unbedeutender Ammoniakgehalt vorher durch Destillation mit Magnesia ermittelt war,¹⁾ und, nachdem die Lösung vollkommen klar geworden (was in diesem Versuche nach 1½ Stunden eintrat), bestimmte ich den in 10 ccm. dieser Lösung enthaltenen Gesamtstickstoff, sodann an einer Anzahl in verschiedenen Verdauungsperioden entnommenen Proben den während der Digestion gebildeten, durch Magnesia austreibbaren Stickstoff. Bei der Berechnung dieses «Amidstickstoffs» in Procenten des Gesamtstickstoffs ist die in 10 ccm. Pepsinsalzsäurelösung vor Anfang der Verdauung enthaltene geringe Menge Ammoniakstickstoff vom Gesamtstickstoff der Serumalbuminlösung stets in Abzug gebracht. Ich erhielt so die in folgender Tabelle VIII zusammengestellten Resultate.

Tabelle VIII.

Verdauungs- zeit	Amidstickstoff in % des Gesamtstickstoffs		
	Analyse I	Analyse II	Im Mittel
2 Stunden	0,53	0,71	0,62
2 Tage	1,24	1,33	1,28
6 „	1,95	2,12	2,03
15 „	2,03	2,12	2,07

¹⁾ Die Magnesia wurde zuerst, wie von Hausmann (l. c. S. 98) empfohlen, in kleinen Portionen geglüht, dann mit Wasser in einen Destillirkolben gebracht und längere Zeit im Sieden erhalten; jede Spur

Serumalbumins eine geringe, allmählich bis zu $\frac{1}{50}$ des Gesamtstickstoffs ansteigende und nach dem 6. Tag des Verdauungsprocesses nicht mehr merklich zunehmende Menge von durch Magnesia austreibbarem Stickstoff. Ob dieser Stickstoff neugebildetem Ammoniak entspricht oder aber dem Stickstoff von Säureamiden, welche schon bei Destillation mit Magnesia Ammoniak abgeben, wurde nicht untersucht. Jedenfalls entspricht dieser aus Eiweiss so leicht erhältliche Stickstoff einem Theile des beim Kochen der Eiweisskörper mit Säuren zur Abspaltung gelangenden, den Hausmann als Amidstickstoff bezeichnet hat. Dies der Grund, warum ich die gleiche Bezeichnung angewandt habe. Bemerkenswerth ist, dass die auf diese Weise ermittelte Zahl (2,07) ungefähr ein Drittel des durch Hausmann¹⁾ bei Spaltung des Serumalbumins mit siedender concentrirter Salzsäure gefundenen Amidstickstoffs (6,34% des Gesamtstickstoffs) darstellt.

III. Versuche mit Casein.

Die Versuche mit Casein wurden in ganz ähnlicher Weise wie jene mit Serumalbumin durchgeführt.

Die Caseinmenge war so gewählt, dass die Verdauungsflüssigkeit nach erfolgter Lösung in 10 ccm.

0,03835 g	} im Mittel 0,0385 g Stickstoff enthielt.
0,03857 "	
0,03858 "	

Drei Stunden nach Ansetzen des Verdauungsversuches ist das Casein vollständig aufgelöst; die Lösung behält jedoch eine opalescirende Beschaffenheit. Nach 4 stündiger Verdauung bleibt das Neutralisationspräcipitat aus. Nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden Verdauung wurde jedesmal ein Volumen von genau 100 ccm. entnommen und darin die Vertheilung des Stickstoffs auf die verschiedenen Albumosen und die durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Ver-

von etwa vorhandenem Ammoniak ist dann sicher vertrieben. Die übrigbleibende geringe Flüssigkeitsmenge lässt man nun erkalten und nach Zusatz der zu prüfenden Lösung erhitzt man sorgfältig das Gemisch und fängt das freigewordene Ammoniak in $\frac{1}{10}$ normaler Schwefelsäure auf.

1) W. Hausmann, l. c., S. 105.

dauungsprodukte untersucht. Um unnöthige Weitschweifigkeit zu vermeiden, beschränke ich mich darauf, in folgender Tabelle (IX) die aus den verschiedenen Analysen hervorgehenden, in Procenten des Gesamtstickstoffs berechneten Zahlen aufzuführen.

Tabelle IX.

Analysirte Lösung		% N		
		Analyse I	Analyse II	im Mittel
Nach 4 Stunden Verdauung	Filtrat α	76,09	76,20	76,14
	„ β	75,64	75,73	75,68
	„ γ	56,27	56,47	56,37
	„ δ	53,01	53,84	53,42
	„ ε	50,36	50,99	50,67
Nach 8 Stunden Verdauung	Filtrat α	83,58	83,77	83,67
	„ β	77,15	77,34	77,24
	„ γ	58,67	59,30	58,98
	„ δ	55,24	56,09	55,66
	„ ε	—	—	—
Nach 24 Stunden Verdauung	Filtrat α	92,40	92,76	92,58
	„ β	84,36	84,57	84,46
	„ γ	72,43	72,70	72,56
	„ δ	62,27	62,42	62,34
	„ ε	55,94	57,98	56,96
Nach 48 Stunden Verdauung	Filtrat α	94,94	95,52	95,23
	„ β	88,43	88,52	88,47
	„ γ	75,87	76,53	76,20
	„ δ	70,15	70,56	70,35
	„ ε	65,80	—	—
Nach 72 Stunden Verdauung	Filtrat α	96,12	96,49	96,30
	„ β	94,74	95,13	94,98
	„ γ	82,80	83,07	82,98
	„ δ	79,76	80,10	79,93
	„ ε	65,24	—	—

Aus diesen Zahlen berechnen sich für die einzelnen Fractionen nachstehende Stickstoffwerthe.

Tabelle X.

Verdauungszeit	% N enthalten in						den anderen Verdauungsprodukten	
	den Albumosen						durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar
	«Primäre» Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Gesamtmenge			Gesamtmenge
4 Stunden	23,86	0,46	19,31	2,95	46,58	2,75	50,67	53,42
8 >	16,33	6,43	18,26	3,32	44,34	—	—	55,66
24 >	7,42	8,12	11,90	10,22	37,66	5,38	56,96	62,34
48 >	4,77	6,76	12,27	5,85	29,65	4,55	65,80	70,35
72 >	3,70	1,37	12,00	3,00	20,07	14,69	65,24	79,93

In Tafel II finden sich die auf Albumosen bezüglichen Zahlen graphisch verzeichnet.

Im Allgemeinen entsprechen diese Resultate den beim Serumalbumin gefundenen, wenn man dem weit trägeren Verlauf der Verdauung beim Casein Rechnung trägt. Der Stickstoff im Gesamtbestand der Albumosen vermindert sich Anfangs sehr schnell, beträgt nach 4stündiger Verdauung nicht mehr ganz die Hälfte, nach dem dritten Tage nur noch ein Fünftel des Gesamtstickstoffs. Auch bezüglich des Caseins gilt die Beobachtung, dass die Maximalmengen der verschiedenen Albumosen nicht zusammenfallen, und dass die Summe der «primären» Albumosen, sowie die Deuteroalbumose B ein höheres Maximum aufweisen als die Deuteroalbumosen A und C. Endlich entstehen auch hier schon nach 4stündiger Verdauung reichlich die Biuretreaction nicht mehr gebende, aber zum Theil durch Gerbsäure fällbare Verdauungsprodukte, deren Menge bis zur 48. Stunde zunimmt, dann während der folgenden 24 Stunden unverändert bleibt. Die durch Zinksulfat nicht mehr, wohl aber durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verdauungsprodukte sind immer in sehr kleiner Menge vorhanden, wenn sie sich auch allmählich vermehren, und da die Peptone nur einen Theil dieser Körper bilden, so erscheint hier die verhältnissmässig spärliche Bildung von Peptonen noch auf-

fallender wie beim Serumalbumin. In Betreff der Albumosen sehen wir wiederum, dass im Anfang die «primären» Albumosen und die Deuteroalbumose B vorwiegen, während die Deuteroalbumosen A und C nur in kleineren Mengen auftreten. Die Summe der «primären» Albumosen und die Deuteroalbumose B sind von der 4. Stunde ab im Abnehmen, die Deuteroalbumosen A und C im Zunehmen begriffen. Die Abnahme der «primären» Albumosen ist im Laufe des ersten Tags eine erhebliche, später eine langsamere. Die nach 4stündiger Verdauung nur in Spuren vorhandene Deuteroalbumose A steigt ihrer Menge nach in kurzer Zeit an und sinkt dann fast ebenso schnell, nachdem sie etwa in der 24. Stunde ihr Maximum erreicht hat. Zwischen der 24. und 72. Stunde scheint die Deuteroalbumose B quantitativ unverändert zu bleiben, denn die eintretende, sehr geringe Zunahme fällt innerhalb der Fehlergrenzen. Abweichend von den Erfahrungen am Serumalbumin gestaltet sich das Verhalten der Deuteroalbumose C. Sie fand sich hier schon nach 4stündiger Verdauung in grösserer Menge als Deuteroalbumose A, erreichte ihr Maximum in gleicher Zeit wie A, zeigte hierauf ein schnelles Absinken, blieb jedoch nach 72 Stunden in grösserer Menge als A zurück. Während beim Serumalbumin am Schluss* des Versuches die Deuteroalbumose C weitaus an Menge die anderen Albumosen übertraf, fand sich beim Casein dasselbe Verhalten bei der Deuteroalbumose B.

In einem nach 2 Stunden unterbrochenen Verdauungsversuch erwiesen sich 83,43% des Gesamtstickstoffs in Acidalbumin und Albumosen enthalten; der Rest von 16,57% war in Spuren von Peptonen, zum grössten Theil aber in die Biuretreaction nicht mehr gebenden Verdauungsprodukten enthalten. Das nach vollkommener Fällung der Albumosen durch Zinksulfat gewonnene Filtrat gab in der That eine äusserst schwache Biuretreaction, enthielt aber durch Gerbsäure fällbare Stoffe. Es lieferte sonach auch das Casein, anscheinend sehr frühzeitig, allerdings in geringerem Maasse als das Serumalbumin, Verdauungsprodukte, welche die Biuretreaction nicht mehr gaben.

Ein anderer, nach 6 tägiger Verdauung unterbrochener

Versuch ergab, dass nur noch 16,95% des Caseinstickstoffes in Form von Albumosen, die übrigen 83,05% in Form von Peptonen und anderen Verdauungsprodukten vorhanden waren.

Ferner habe ich mit einer 2%igen Caseinlösung eine in folgender Tabelle (XI) zusammengefasste qualitative Versuchsreihe zur Ermittlung der Anfangs- und Endprodukte der Caseinverdauung durchgeführt. Das Casein wurde dabei bereits nach 2 1/2 Stunden vollkommen aufgelöst gefunden.

Tabelle XI.

Verdauungszeit	Neutralisationspräcipitat (Acidalbumin)	« Primäre » Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
1/2 Stunde	positiv	positiv	positiv	negativ	Spuren	negativ
1 »	»	»	»	positiv	»	»
1 1/2 Stunden	» (Max.)	» (Max.)	»	»	positiv	Spuren
2 »	»	»	»	»	»	»
2 1/2 »	»	»	»	»	»	»
3 »	»	»	»	»	»	positiv
3 1/2 »	negativ	»	»	» (Max.)	»	»
4 »	»	»	»	»	»	»
6 »	»	»	» (Max.)	»	» (Max.)	»
2 Tage	»	»	»	»	»	»
4 »	»	»	»	»	»	»
6 »	»	»	Spuren	Spuren	»	»
8 »	»	»	»	negativ	»	»
10 »	»	»	»	»	»	»
12 »	»	»	negativ	»	»	»
14 »	»	»	»	»	»	»
16 »	»	»	»	»	»	»
18 »	»	Spuren	»	»	»	»
20 »	»	»	»	»	»	»
22 »	»	»	»	»	»	»
24 »	»	»	»	»	»	»
26 »	»	»	»	»	»	»
28 »	»	»	»	»	»	»

Aus dieser Tabelle (XI) geht hervor, dass sogleich bei Beginn der Caseinverdauung neben Acidalbumin eine beträcht-

liche Menge von «primären» Albumosen, ein geringeres Quantum der Deuteroalbumose A und Spuren von Deuteroalbumose C auftreten. Deuteroalbumose B und Peptone sind noch nicht vorhanden, während doch schon in dem von Albumosen und Zinksulfat befreiten Filtrat die Gerbsäure einen Niederschlag erzeugt. Das Acidalbumin erreicht sein Maximum nach $1\frac{1}{2}$ Stunden und verschwindet vollständig nach $3\frac{1}{2}$ Stunden. Bei den «primären» Albumosen und dem Acidalbumin treffen die Maxima zusammen, dann sinkt die Menge der «primären» Albumosen allmählich, aber noch nach 28 tägiger Verdauung sind sie in Spuren nachweisbar. Die Deuteroalbumose A erreicht ihr Maximum nach 6 stündiger Verdauung, nach 6 Tagen bleiben von ihr nur noch Spuren übrig, die dann zwischen dem 10. und dem 12. Tage der Verdauung endgültig verschwinden. Hingegen erscheint die Deuteroalbumose B sofort nach der ersten Stunde; sie erreicht ihr Maximum nach $3\frac{1}{2}$ Stunden, ist nach 6 Tagen nur noch in Spuren nachweisbar und verschwindet vollständig vor Ende des 8. Tages. Die Deuteroalbumose C, welche sofort bei Beginn der Verdauung auftritt, erscheint in ansehnlicher Menge erst nach $1\frac{1}{2}$ Stunden, erreicht das Maximum nach 6 Stunden, zeigt alsdann zunächst ein schnelles und später bis zum 20. Tag ein langsames Absinken; schliesslich bleibt von ihr noch am 28. Tag eine geringe Menge zurück. Die Peptone erscheinen nach $1\frac{1}{2}$ Stunden Verdauung, jedoch nur in Spuren. Erst von der dritten Stunde ab sind sie in ansehnlicher Menge vorhanden.

Zu bemerken ist, dass man bei der Caseinverdauung die zwei Maxima vermisst, welche bei der Serumalbuminverdauung sicher für die Deuteroalbumose B nachweisbar sind. Alexander¹⁾ hat als Hauptbestandtheil im Gemenge der «primären» Albumosen des Caseins Protalbumose gefunden, daneben nur ganz geringe Mengen einer Substanz vom Verhalten der Heteroalbumose. Nach seiner Ansicht ist auch das reinste bisher darstellbare Casein noch durch eine kleine Menge

¹⁾ F. Alexander, Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898, S. 411.

eines albuminatähnlichen Eiweisskörpers verunreinigt, dem möglicher Weise das Auftreten einer geringen Menge von Heteroalbumose zuzuschreiben ist. Seitdem ist es Wróblewski¹⁾ in der That gelungen, aus der Milch einen neuen Eiweisskörper, den er Opalisin nennt, zu isoliren, und es ist denkbar, dass die von Alexander gefundene geringe Menge Heteroalbumose von diesem Körper abstammt. Es könnte auch sein, dass die Abwesenheit des Heteroalbumosencomplexes im Caseinmolekül auch die Abwesenheit einer zweiten, aus der Heteroalbumose hervorgehenden Deuteroalbumose B bedingt, und dass die zwei bei der Deuteroalbumose B des Serumalbumins beobachteten Maxima der Gegenwart zweier verschiedener B-Albumosen zuzuschreiben sind.

Die Anfangs- und Endprodukte der Verdauung sind bei Serumalbumin und Casein etwas verschieden. In dem einen wie in dem anderen Fall findet man nach der ersten halben Stunde «primäre» Albumosen, Deuteroalbumose A und die Biuretreaction nicht gebende Verdauungsprodukte, während Peptone noch fehlen. Erscheint aber beim Serumalbumin die Deuteroalbumose B ohne C, so entsteht aus Casein die Deuteroalbumose C ohne B. In beiden Fällen finden wir als Endprodukte Peptone und Deuteroalbumose C, daneben beim Casein Spuren von «primären» Albumosen. Das Acidalbumin verschwindet immer vor jedem anderen Verdauungsprodukt; bei der Serumalbuminverdauung erfolgt sodann ein allmähliches Abnehmen zuerst der Deuteroalbumose A, dann der «primären» Albumosen und endlich der Deuteroalbumose B, während bei der Caseinverdauung die Deuteroalbumose B vor A verschwindet.

Gleich wie bei dem Serumalbumin bestimmte ich in einer 2%igen Caseinlösung durch Abdestilliren mit Magnesia den locker gebundenen, während der peptischen Verdauung auftretenden Stickstoff.

¹⁾ A. Wróblewski, Ein neuer eiweissartiger Bestandtheil der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, 1898, S. 308.

Tabelle XII.

Verdauungszeit	Amidstickstoff in % des Gesamtstickstoffs		
	Analyse I	Analyse II	im Mittel
6 Stunden	0,14	0,37	0,25
3 Tage	2,08	2,08	2,08
6 „	2,55	2,58	2,56
15 „	3,76	3,90	3,83

Wie ersichtlich, ist die im Laufe der Caseinverdauung entstehende Amidstickstoffmenge Anfangs sehr gering; sie erfährt alsdann langsame Zunahme und erreicht nach 15 Tagen beinahe $\frac{1}{25}$ des Gesamtstickstoffs. Hausmann¹⁾ fand, dass bei Spaltung des Caseins mit siedender concentrirter Salzsäure 13,37 % des Gesamtstickstoffs in Form von Ammoniak erhalten werden. Es ist möglich, dass in einem bestimmten Moment des Verdauungsprocesses die Bildung von Amidstickstoff aufhört, wie ich es bei dem Serumalbumin beobachten konnte; doch habe ich einschlägige Versuche nicht angestellt.

IV. Versuche mit krystallisirtem Eialbumin und mit Serumglobulin.

Weiter habe ich noch zwei Versuchsreihen zur Ermittlung des zeitlichen Auftretens und Verschwindens der Verdauungsprodukte des krystallisirten Eialbumins und des Serumglobulins durchgeführt. Die Resultate beider Versuchsreihen sind in den Tabellen XIII und XIV wiedergegeben.

¹⁾ W. Hausmann, l. c., S. 105.

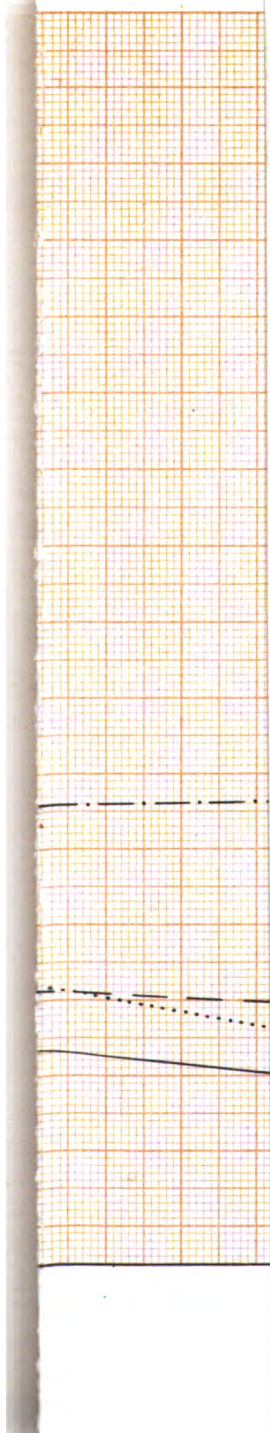
a) Krystallisiertes Eieralbumin.

Tabelle XIII.

Verdauungszeit	Neutralisationspräcipitat (Acidalbumin)	«Primäre» Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
1/2 Stunde	Negativ	Spuren	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
1 »	Positiv	Positiv	Spuren	Positiv (I. Max.)	Spuren	»
1 1/2 »	»	»	»	» } im Ab-	»	»
2 Stunden	»	»	Positiv	» } nehmen	Positiv	Spuren
4 »	» (Max.)	»	»	» } im Za-	»	Positiv
8 »	Negativ	» (Max.)	» (Max.)	» } nehmen	»	»
1 Tag	»	»	»	» } nehmen	» (Max.)	»
2 Tage	»	»	»	» (II. Max.)	»	»
3 »	»	»	»	»	»	»
4 »	»	»	»	»	»	»
5 »	»	»	Spuren	»	»	»
6 »	»	Spuren	»	»	»	»
7 »	»	»	Negativ	»	»	»
8 »	»	Negativ	»	»	»	»
9 »	»	»	»	»	»	»
10 »	»	»	»	Spuren	Spuren	»
11 »	»	»	»	»	»	»
12 »	»	»	»	»	»	»
13 »	»	»	»	»	»	»
14 »	»	»	»	»	»	»
15 »	»	»	»	»	»	»

Es wurden etwa 2 g des Eiweisskörpers auf 100 ccm. Verdauungsflüssigkeit genommen. Die Lösung des coagulierten Präparats war erst nach 6 Stunden vollendet.

Nach einer halben Stunde Verdauungszeit erhielt ich als Verdauungsprodukte nur Spuren von «primären» Albumosen, weder Acidalbumin noch Deuteroalbumosen oder Peptone. Nach einer Stunde erschienen die verschiedenen Deuteroalbumosen und das Acidalbumin, letzteres sowie die «primären» Albumosen und besonders die Deuteroalbumose B in schon nennenswerther Menge, A und C hingegen nur spurenweise; Peptone fehlten ganz. Wie Tabelle XIII zeigt, erreicht das Acidalbumin sein Maximum nach 4stündiger Verdauung; nach



8 Stunden ist es vollständig verschwunden. Das Maximum der «primären» Albumosen ist nach 8 Stunden erreicht; nach 6 Tagen finden sich nur noch Spuren, und am 8. Tag der Verdauung sind auch diese verschwunden. Die Deuteroalbumose A tritt in ansehnlicher Menge erst nach 2 Stunden auf; ihr Maximum fällt mit jenem der «primären» Albumosen zusammen; nach fünf Tagen sind nur noch Spuren vorhanden, welche vor Ablauf des siebenten Tages auch noch verschwinden. Die Deuteroalbumose B erreicht ihr Maximum sogleich bei ihrem Auftreten nach einstündiger Verdauungszeit. Nach einer bis zur zweiten Stunde anhaltenden Abnahme beobachtet man von neuem eine allmähliche Vermehrung, welche am dritten Tag zu einem zweiten Maximum führt, das höher ist als das erste, hierauf folgt ein zuerst schnelles, später unmerkliches Abnehmen. Vom 10. Tag an bleibt die Menge unverändert; 15 Tage nach Beginn des Versuches sind immer noch Spuren nachzuweisen. Die Deuteroalbumose C erscheint in nennenswerther Menge erst nach der zweiten Stunde; das Maximum ist nach 2 Tagen erreicht, dann folgt eine Verminderung, nach welcher vom 10. Tag ab nur Spuren zurückbleiben. Die erste Andeutung von Peptonen findet sich nach 2stündiger Verdauung; nach 4 Stunden treten sie in nennenswerther Menge auf und sind noch am 15. Tage des Versuches vorhanden.

Die Deuteroalbumose B zeigt, wie beim Serumalbumin, zwei Maxima. Die Verwandtschaft zwischen Eieralbumin und Serumalbumin ist ferner dadurch gekennzeichnet, dass auch hier die Deuteroalbumose A zuerst verschwindet, sodann die «primären» Albumosen. Als Endprodukte der Verdauung gibt das krystallisierte Eieralbumin gleich dem krystallisierten Serumalbumin Peptone und Spuren von C, aber beim Eieralbumin bleibt auch eine gewisse Menge der Deuteroalbumose B zurück und zwar mehr als von C.

Die Thatsache, dass vor dem Auftreten des Acidalbumins schon Spuren von «primären» Albumosen unter den Verdauungsprodukten nachzuweisen sind, widerspricht besonders schlagend der verbreiteten Annahme, nach welcher die «primären» Albumosen vom Acidalbumin abstammen sollen. Im-

merhin soll nicht ausser Betracht gelassen werden, dass die zum Nachweis des Acidalbumins herangezogene Methode (die Neutralisation) bei sehr kleinen Mengen etwas weniger verlässlich ist als das Aussalzen der Albumosen mit Zinksulfat, und es kann daher nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Spuren von Acidalbumin schon nach der ersten halben Stunde auftreten. Wie dem auch sein mag, sicher ist das bei Casein und krystallisiertem Serumalbumin schon beobachtete gleichzeitige Vorhandensein von Albumosen und Acidalbumin im Beginn des Verdauungsprocesses auch bei dem krystallisierten Eieralbumin gegeben, während bei allen hier in Frage stehenden Substanzen die Peptone erst später auftreten.

b) Serumglobulin.

Tabelle XIV.

Verdauungszeit	Neutralisationspräcipitat (Acidalbumin)	«Primäre» Albumosen	Deuteroalbumose A	Deuteroalbumose B	Deuteroalbumose C	Peptone
$\frac{1}{2}$ Stunde	positiv	positiv	Spuren positiv	Spuren positiv	Spuren positiv	negativ
1 »	»	»	»	»	»	Spuren positiv
1 $\frac{1}{2}$ Stunden	»	»	»	»	»	»
2 »	»	» (Max.)	»	»	»	»
4 »	» (Max.)	»	» (Max.)	»	»	»
8 »	negativ	»	»	» (Max.)	»	»
1 Tag	»	»	»	»	»	»
2 Tage	»	»	Spuren negativ	»	» (Max.)	»
3 »	»	Spuren negativ	»	»	»	»
4 »	»	»	»	»	»	»
5 »	»	»	»	Spuren negativ	»	»
6 »	»	»	»	»	»	»
7 »	»	»	»	»	»	»
8 »	»	»	»	»	»	»
9 »	»	»	»	»	Spuren	»
10 »	»	»	»	»	»	»
11 »	»	»	»	»	»	»
12 »	»	»	»	»	»	»

Die Menge des Globulins auf 100 ccm. Verdauungslösung betrug etwa 2 g. Während beim krystallisierten Eieralbumin

die Auflösung noch langsamer verläuft als beim Casein, löst sich das Serumglobulin fast ebenso schnell (fast nach 2 Stunden in obiger Versuchsreihe) wie das krystallisirte Serumalbumin. Schon nach einer halben Stunde findet man Acidalbumin, «primäre» Albumosen, sowie Spuren der Deuteroalbumosen A, B und C. Die Peptone erscheinen, wie bei dem Serumalbumin, schon nach einer Stunde, in nennenswerther Menge nach 1½ Stunden, und sie finden sich auch noch am 12. Tage der Verdauung. Das Acidalbumin erreicht sein Maximum nach 4stündiger Verdauung, verschwindet vollständig nach 8 Stunden. Die verschiedenen Deuteroalbumosen treten in beträchtlicher Menge nach 1stündiger Verdauung auf. Das Maximum erreichen die «primären» Albumosen nach 2, die Deuteroalbumose A nach 4 Stunden; die Deuteroalbumose B, welche wie beim Casein ein einziges Maximum hat, erreicht dasselbe nach 8 Stunden. Bei Deuteroalbumose C ist die grösste Menge nach 2 Tagen zu beobachten; vom 9. Tag ab bis zum Ende des Versuches ist sie nur in Spuren nachweisbar. Das Serumglobulin liefert die gleichen Endprodukte wie das Serumalbumin, nämlich Peptone und Spuren von C. Auch verschwinden die anderen Verdauungsprodukte dieser beiden Körper in derselben Reihenfolge, und zwar zunächst schon vor Ablauf des ersten Tages das Acidalbumin, dann nacheinander die Deuteroalbumose A, die «primären» Albumosen, die Deuteroalbumose B.

Erwähnen möchte ich noch, dass in beiden Versuchsreihen (Tab. XIII und XIV) nach vollständiger Fällung der Albumosen und Abscheiden des Zinks die Flüssigkeiten, u. s. w. bei dem Eieralbumin nach 1stündiger, beim Serumglobulin nach ½stündiger Verdauung mit Gerbsäure Niederschläge gaben, welche sich in einem Ueberschuss des Reagens wieder auflösten.

V. Schlussbemerkungen.

Auf Grund der Beobachtungen Kühne's¹⁾ und seiner Schüler, namentlich Neumeister's, nimmt man an, dass

¹⁾ W. Kühne und R. H. Chittenden, Zeitschr. f. Biologie. N. F., Bd. I, 1883, S. 159; Bd. II, 1884, S. 11; Bd. IV, 1886, S. 409 u. 423;

das Eiweissmolekül durch Pepsinverdauung zunächst in Acidalbumin, dann in «primäre» Albumosen, dann in Deuteroalbumosen, am Schluss in echte Peptone übergeführt wird. Peptone sollen überhaupt das niedrigste Produkt der durch Pepsinsalzsäure erreichbaren Eiweisssspaltung darstellen. Durch den von E. P. Pick¹⁾ geführten Nachweis, dass bei Pepsinverdauung nicht weniger als drei Deuteroalbumosen und zwei verschiedene Peptone entstehen, erfuhr das Schema der Kühne'schen Schule eine Complication, und da Pick's an Witte-Pepton gemachte Beobachtungen durch Umber²⁾ und Alexander³⁾ an reinen Eiweisskörpern in allen wesentlichen Punkten bestätigt wurden, ist es dringend geboten, zu untersuchen, inwieweit das angeführte Schema den neuen Thatsachen gegenüber ausreicht.

Obgleich meine Untersuchungen nicht direkt darauf gerichtet waren die genetischen Beziehungen der peptischen Spaltungsprodukte klar zu legen, so haben sie doch einiges Material zur Lösung dieser wichtigen Frage beigebracht. Ich kann daher bei Zusammenfassung meiner Ergebnisse dieses Moment nicht ausser Acht lassen. Ich kann mich dabei in erster Reihe auf die quantitativen Versuche mit krystallisiertem Serumalbumin und gereinigtem Casein stützen, in denen die analytischen Zahlen eine besonders überzeugende Sprache führen (ich verweise in dieser Beziehung auf die graphischen Darstellungen in Tafel I und II), sodann in zweiter Linie auf die Versuchsreihen betreffend den zeitlichen Verlauf der Eiweisssspaltung, bei denen nicht bloss die angeführten Eiweissstoffe, sondern auch krystallisiertes Eialbumin und gereinigtes Serumglobulin zur Verwendung kamen. Um einen Ueberblick dieser Versuchsreihen zu ermöglichen, habe ich ihre Ergebnisse in umstehender Uebersichtstabelle zusammengestellt.

Bd. VII, 1888, S. 358. — W. Kühne, Zeitschr. f. Biologie, N. F., Bd. XI, 1892, S. 1 und 308.

1) E. P. Pick, l. c.

2) F. Umber, Die Spaltung des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898. S. 258.

3) F. Alexander, l. c.

Von den Ergebnissen dieser Versuche sei zunächst hervor-
gehoben, dass sich die durch Salzfällung unterscheidbaren
Produkte der Pepsinverdauung auch in Betreff ihres Auftretens
und weiteren Schicksals ungleich verhalten. Würde es sich
bei der fractionirten Abscheidung der Deuteroalbumosen um
eine künstliche, durch unwesentliche, zufällige Momente be-
dingte Trennung handeln, so könnte Auftreten und Verschwinden
derselben unmöglich einen regelmässigen Verlauf erkennen
lassen. Nun ist aber für jede Fraction der Zeitpunkt ihres
Entstehens und Verschwindens sowie des Maximums ein anderer,
wobei sich wieder für die verschiedenen Eiweissstoffe merk-
liche, möglicherweise charakteristische Verschiedenheiten er-
geben. Bei den einzelnen Deuteroalbumosen handelt es sich
sonach um Complexe, die nicht bloss von der Proto- und
Heteroalbumose und von einander chemisch verschieden, son-
dern auch durch ihr quantitatives und zeitliches Auftreten
in den einzelnen Phasen der Verdauung individuell charakterisirt
sind. Was hier noch etwa fraglich bleibt, ist die Zahl dieser
Deuteroalbumosen, und zwar nicht in der Richtung, dass man
sie etwa zu hoch, sondern im Gegentheil, dass man sie noch
zu niedrig veranschlagt.

Wie ich vor Kurzem ausgeführt habe,¹⁾ hat man Grund,
im Witte-Pepton die Anwesenheit von zwei Deuteroalbumosen A
anzunehmen, wovon die erste (A α) allerdings nur in ver-
schwindender Menge vorhanden sein kann. Das Verhalten der
Deuteroalbumose A in meinem Zeitversuch (Tabelle VII), wo-
nach sie zunächst nach halbstündiger Verdauung deutlich nach-
weisbar ist, dann bis auf Spuren verschwindet, dann aber zu
einem in der zweiten Stunde erreichten Maximum ansteigt,
lässt die Deutung zu, dass es sich auch in diesem Fall um
zwei verschiedene A-Albumosen gehandelt hat.

Viel deutlicher als hier ist das Auftreten zweier Maxima
bei der Deuteroalbumose B des Serumalbumins und des Eier-
albumins (nicht des Caseins und des Serumglobulins) aus-
gesprochen.

¹⁾ E. Zunz, l. c., S. 239.

Untersucher Eiweisskörper	Versuchs- tabellen	Voll- ständig in Lösung ge- gangen nach Stunden	Acidalbumin			Proto- und Hetero- albumose		
			Auf- treten	Maxi- mum	Ver- schwin- den	Auf- treten	Maxi- mum	Ver- schwin- den
			in Stunden			in Stunden		
Krystallisirtes Serumalbumin	III und V	1 1/2	—	—	vor 2	vor 2	2	noch nach 3X24 vor- handen
	VII	2	vor 1/2	1	2	1/2	2	vor 4X24
Serumglobulin	XIV	2	vor 1/2	4	vor 8	vor 1/2	2	vor 4X24
Krystallisirtes Eieralbumin	XIII	6	vor 1	4	vor 8	1/2	8	vor 8X24
Casein	X	3	—	—	vor 4	vor 4	4	noch nach 3X24 vor- handen
	XI	2 1/2	vor 1/2	1 1/2	3 1/2	vor 1/2	1 1/2	noch nach 28X24 Spar-2

Tabelle XV.

Deuteroalbumose A			Deuteroalbumose B			Deuteroalbumose C			Peptone Auftreten in Stunden
Auf- treten	Maxi- mum	Ver- schwin- den	Auf- treten	Maxi- mum	Ver- schwin- den	Auf- treten	Maxi- mum	Ver- schwin- den	
in Stunden			in Stunden			in Stunden			
vor 2	4	vor 2×24	vor 2	2 und 8	noch nach 3×24 vor- handen	vor 2	2×24	noch nach 3×24 deutlich vor- handen	vor 2
vor $\frac{1}{2}$	($\frac{1}{2}$) und 2	vor 3×24	vor $\frac{1}{2}$	2	vor 5×24	1	3×24	noch nach 16×24 Spuren	1
$\frac{1}{2}$	4	vor 3×24	$\frac{1}{2}$	8	vor 6×24	$\frac{1}{2}$	2×24	noch nach 12×24 Spuren	1
1	8	vor 7×24	vor 1	1 und 3×24	noch nach 15×24 Spuren	1	2×24	noch nach 15×24 Spuren	2
vor 4	24	noch nach 3×24 vor- handen	vor 4	4	noch nach 3×24 deutlich vor- handen	vor 4	24	noch nach 6×24 vor- handen	vor 4
vor $\frac{1}{2}$	6	vor 12×24	vor 1	$3 \frac{1}{2}$	vor 8×24	$\frac{1}{2}$	6	noch nach 28×24 deutlich vor- handen	$1 \frac{1}{2}$

Diese Erscheinung zeigt, dass die Bildung der B-Albumose zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Verdauung besonders reichlich erfolgt, sie sagt aber nichts darüber aus, ob es sich um eine und dieselbe Substanz handelt. Da das erste Maximum auf einen Zeitpunkt fällt, wo das ursprüngliche Eiweiss und das daraus hervorgegangene Acidalbumin eben verschwunden sind, so kann man die hier vorhandene B-Albumose als ein direkt aus ihnen hervorgegangenes Produkt ansehen; die B-Albumose, welche das viel später auftretende zweite Maximum bildet, kann aber nicht aus gleicher Quelle stammen: sie muss aus anderen Zwischenprodukten — wie der Verlauf der Curve zeigt, aus den «primären» Albumosen — hervorgegangen sein. Diesem verschiedenen Ursprung kann aber auch eine verschiedene chemische Beschaffenheit entsprechen. Wenngleich meine Versuche eine Entscheidung dieser Frage nicht ermöglichen, so bin ich doch durch gütige Mittheilung des Herrn Dr. E. P. Pick in die Lage gesetzt, die letztere Alternative als die bei weitem wahrscheinlichere zu bezeichnen, da es ihm gelang, tiefgreifende Unterschiede zwischen der direkt aus Witte-Pepton erhältlichen und den durch Verdauung von «primären» Albumosen entstehenden B-Albumosen nachzuweisen.

In Betreff der genetischen Beziehungen, in welchen die erhaltenen Produkte zu einander stehen, ist zunächst hervorzuheben, dass das Auftreten von Acidalbumin stets von der Bildung von Albumosen begleitet war. In einem Fall (krystallisiertes Eialbumin) fanden sich sogar Spuren von «primären» Albumosen schon nach einer halben Stunde Verdauungszeit, während die übrigen Fractionen, das Acidalbumin inbegriffen, erst nach einstündiger Verdauungszeit nachgewiesen wurden. Es bestätigt dies eine Angabe Klug's,¹⁾ wonach Syntonin und Albumosen sich schon 5 Minuten nach Beginn der Pepsinwirkung nebeneinander nachweisen lassen. Diese Bildung von Albumosen neben Acidalbumin ist aber gewiss nicht eine der Pepsinwirkung allein zukommende Erscheinung. F. Gold-

1) Ferd. Klug, Untersuchungen über Pepsinverdauung. Pflüger's Archiv f. d. gesammte Physiolog., Bd. 60, 1895, S. 43.

schmidt¹⁾ beobachtete in seinen Versuchen über die Einwirkung von Säuren auf krystallisiertes Serumalbumin, dass Albumosen zugleich mit dem Acidalbumin entstanden, öfter sogar schon zu einer Zeit, wo noch jede Spur von Acidalbumin vermisst wurde. Selbstverständlich darf man dabei nicht die etwas geringere Empfindlichkeit des zur Entdeckung des Acidalbumins gebrauchten Verfahrens ausser Acht lassen. Auch wenn man diesem von Goldschmidt selbst hervorgehobenen Umstand Rechnung trägt, wird man seine Annahme berechtigt finden, dass die Bildung von Acidalbumin durch Abspaltung von Albumosen-complexen erfolgt und ihr auch für die Pepsinverdauung Gültigkeit zusprechen.

Durch diesen Befund wird der Bezeichnung späterer Spaltungsprodukte als «primär» vorgegriffen. Strenggenommen sind ja nur das Acidalbumin und die daneben entstehenden Substanzen primäre Spaltungsprodukte, die später aus Acidalbumin entstehenden aber nicht mehr. Zur Zeit lässt sich jedoch diese Scheidung nicht durchführen, da über den Vorgang der Acidalbuminbildung nicht ausreichende Untersuchungen vorliegen, da es überdies den Eindruck macht, als ob die neben Acidalbumin auftretenden Produkte — die Albumosen — nicht von den bei weiterer Verdauung aus Acidalbumin entstehenden verschieden wären. Goldschmidt fand, dass bei Säureeinwirkung auf Serum- und Eieralbumin sofort neben Acidalbumin «primäre» Albumosen (im Sinne der Schule Kühne's, vermuthlich Proto- und Heteroalbumose) auftreten, dass daneben beim Eieralbumin auch noch Deuteroalbumosen (A und B) erhalten werden.

Der Einfachheit wegen will ich von der Rolle, welche das Acidalbumin bei der Bildung der Albumosen spielt, absehen, und wie die bisherigen Untersucher alle jene Produkte als «primär» bezeichnen, welche direkt aus dem unveränderten Eiweiss oder aus dem Acidalbumin hervorgehen. Meine Erfahrungen machen nun die schon durch Goldschmidt's Be-

¹⁾ Franz Goldschmidt, Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe. Inaugural-Dissertation, Strassburg 1898.

obachtung nahegelegte Vorstellung zur Gewissheit, dass auch ein Theil der Deuteroalbumosen zu den primären Produkten gehört. Ein Blick auf Tafel I lehrt, dass beim Serumalbumin die Deuteroalbumose B, sobald das Acidalbumin verschwindet, in einer Menge vorhanden ist, welche nicht weit hinter jener der «primären» Albumosen, das heisst der Summe der Proto- und Heteroalbumose, zurückbleibt, während die Deuteroalbumosen A und C an Menge weit zurückstehen. Ebenso zeigt die Deuteroalbumose B des Eieralbumins (vergl. Tabelle XIII) nach einer Stunde ein Maximum, zu einer Zeit, wo die Deuteroalbumosen A und C erst spärlich vorhanden sind. Während betreff der Deuteroalbumose B des Serumalbumins und Eieralbumins kein Zweifel an der primären Natur derselben bestehen kann, ist die Sachlage für die gleiche Albumose des Caseins und des Serumglobulins minder klar. Doch spricht das frühzeitige Auftreten von Deuteroalbumose A beim Casein, ferner der Umstand, dass sie ihr Maximum fast in allen Fällen in den ersten Stunden der Pepsineinwirkung erreicht, dafür, dass wir es auch in diesem Fall möglicherweise mit einem primären Produkt zu thun haben. Eine Entscheidung wird sich hier erst treffen lassen, wenn man die Frage nach der einheitlichen Natur dieser Albumosen endgültig beantwortet hat.

Hingegen kann über die secundäre Natur der Deuteroalbumose C und der «Peptone», das heisst in meinem Fall der nicht durch Zinksulfat, wohl aber durch Phosphorwolframsäure ausfällbaren, die Biuretreaction darbietenden Substanzen, kein Zweifel obwalten. F. Goldschmidt, welcher mit Eier- und Serumalbumin arbeitete, konnte erst nach längerer Einwirkung bei einer Temperatur von 95° C. die Bildung von Deuteroalbumose C und von Peptonen nachweisen, während die «primären» Albumosen und die Deuteroalbumosen A und B leicht bei 40° und sogar schon bei Zimmertemperatur erhalten wurden. Auch in meinen Versuchen traten Deuteroalbumose C und «Peptone» erst nach Bildung der anderen Albumosen auf: das Maximum von Deuteroalbumose C fiel sehr spät, frühestens nach 24 Stunden, und auch die Peptone, deren Maximum nicht

genau zu ermitteln war, liessen eine Zunahme in den vorgeschrittenen Stadien der Verdauung erkennen. Wenn Schrötter¹⁾ die Meinung ausspricht, dass bei der Einwirkung von Säuren das Eiweiss nicht erst in Albumosen und dann in Peptone zerfiele, sondern gleichzeitig in Albumosen und Peptone, dass also die Albumosen keine Zwischenstufe darstellten, so kann ich ihm nicht beistimmen.

Sehr überraschend ist der aus meinen Versuchen hervorgehende Befund, dass sehr bald nach Beginn der Verdauung ein erheblicher Theil des Eiweissstickstoffs in Form von die Biuretreaction nicht mehr gebenden Körpern abgespalten wird. Dieses frühzeitige reichliche Auftreten, noch vor Bildung der Deuteroalbumose C und der Peptone, legt die Vermuthung nahe, dass es sich hier möglicherweise um eine primäre Abspaltung der betreffenden stickstoffhaltigen Substanzen aus dem intacten Eiweiss oder aus Acidalbumin handelt. Die grosse Menge dieser noch unbekannten Spaltungsprodukte macht ihre nähere Untersuchung äusserst wünschenswerth. Ich habe mich dieser Aufgabe nicht mehr widmen können, und bemerke nur, dass sie, zum Theil wenigstens, durch Tannin fällbar waren und bei längerer Dauer des Verdauungsversuches, wie aus Tabelle V hervorgeht, zum Theil in durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen übergingen. Allem Anschein nach stellen diese die Biuretreaction nicht mehr gebenden Stoffe auch die Hauptmasse der bei intensiver Pepsinverdauung gebildeten Endprodukte dar. Inwieweit dieser Befund die angefochtenen Angaben von Hoppe-Seyler²⁾ und seinen Schülern über das Auftreten von Aminosäuren bei Pepsinverdauung sowie auch die ähnlichen gelegentlichen Beobachtungen von Lawrow³⁾ aus jüngster Zeit bestätigt, bleibt dahingestellt.

Als Endprodukte der Pepsinverdauung hat man lange Jahre

1) H. Schrötter, Beiträge zur Kenntniss der Albumosen. Monatsh. f. Chemie, Bd. XVI, 1895, S. 609.

2) F. Hoppe-Seyler, Physiol. Chemie, Bd. II, S. 228. 1878.

3) D. Lawrow, Zus Kenntniss des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 513. 1899.

hindurch allgemein die Peptone (ursprünglich im weiteren Sinn mit Einschluss der Albumosen) angesehen. Nach Chittenden und Hartwell¹⁾ tritt bei der künstlichen peptischen Verdauung irgend eines Eiweissstoffes eine vollständige Umwandlung in Peptone im Sinne Kühne's, wenn überhaupt, doch sehr selten ein. In ihren mit gewöhnlichem geronnenem Eieralbumin und mit Fibrin vorgenommenen Versuchen erhielten sie freilich etwas mehr als 50% Peptone. Die angewandte Methode (Fällung des Acidalbumins durch Neutralisation, Fällung der Albumosen mit Ammonsulfat, Abwägen beider Fractionen und quantitative Bestimmung der Peptone durch Subtraction vom Gesamtgewicht) muss jedoch viel zu hohe Zahlen für Pepton geben, da bei ihr die Gesamtmenge der die Biuretreaction nicht mehr gebenden Verdauungsprodukte als Pepton in Rechnung kommt. Nach meinen Erfahrungen steht die Menge der gebildeten Peptone jederzeit der Menge der unbekannten, nicht mehr die Biuretreaction darbietenden Produkte nach.

Neben Peptonen, Albumose C, und den die Biuretreaction nicht mehr gebenden Körpern, blieb beim Casein noch eine allerdings sehr geringe Menge einer Substanz vom Verhalten der Proto- oder Heteroalbumose, beim Eieralbumin eine gewisse Menge von Deuteroalbumose B (sogar mehr als von C) in der Verdauungslösung zurück. Ob man es hier mit Endprodukten der Verdauung zu thun hat, muss anderweitig entschieden werden.

Im Verlaufe des Verdauungsprocesses wird eine gewisse Menge Stickstoff vom Eiweissmolekül als Ammoniak oder in Form einer Verbindung abgespalten, die bei Destillation mit Magnesia Ammoniak abgibt. Beim Serumalbumin steigt sie allmählich zu einem Maximum an und bleibt dann unverändert. Das Maximum entspricht ungefähr einem Drittel des im Serumalbumin nach Hausmann enthaltenen Amidstickstoffes. Bei

1) R. H. Chittenden and J. A. Hartwell, The relative formation of proteoses and peptones in gastric digestion. *Journal of Physiology*, Bd. XII, 1891, S. 12.

der Verdauung des Caseins ist die absolute Menge des in gleicher Weise abspaltbaren Stickstoffs noch grösser.

Aus dem Angeführten erhellt zur Genüge, dass die Vorstellung, die man sich bisher von der peptischen Eiweiss-spaltung gebildet hatte, eine viel zu einfache war. Die Zahl der direct aus Eiweiss (und Acidalbumin) hervorgehenden primären Produkte ist grösser als man früher anzunehmen geneigt war. Soviel sich zur Zeit übersehen lässt, entstehen mindestens drei, wahrscheinlich aber noch mehr primäre Spaltungsprodukte (sicher Proto- und Heteroalbumose, ein Theil der Deuteroalbumose B, möglicherweise Deuteroalbumose A und auch ein Theil der unbekannten, die Biuretreaction nicht mehr gebenden Substanzen). Es ist zu erwarten, dass auch die Zahl der secundären Produkte sich entsprechend erhöhen wird. Das systematische Studium dieser Abbauprodukte nach der chemischen und physiologischen Seite wird einerseits neue Anhaltspunkte zur Beantwortung der wichtigen Frage nach dem Aufbau der Eiweisskörper ergeben, andererseits neues Material zur Deutung ihrer massgebenden Aufgabe im Stoffwechsel der Zelle beschaffen.

Ueber Nachweis und Vorkommen des Glycocolls.

Von

Karl Spiro,

erstem Assistenten des Instituts.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Strassburg.

Nene Folge Nr. 21.)

(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1899.)

I.

Nachdem Braconnot 1820 beim Kochen von thierischem Leim mit Schwefelsäure das Glycocoll entdeckt hatte,¹⁾ wurde es dann, ebenfalls schon vor längerer Zeit, von Dessaignes bei der Spaltung der Hippursäure mit Salzsäure und von Strecker bei der Zerlegung der Glychoholsäure mittelst Barytwassers aufgefunden. Unter den α -Amidosäuren, welche ja fast 90% des Eiweissmoleküls ausmachen, nimmt also die Amidoeisigsäure insofern eine besondere Stellung ein, als dieselbe unter normalen physiologischen Bedingungen im Organismus zu Synthesen verwerthet wird, gewissermassen als Baustein dem Körper zur Verfügung steht. Wiener hat in jüngster Zeit durch Ermittlung der nach Verfütterung von Benzoesäure ausgeschiedenen Hippursäure die Menge des im Organismus zu synthetischen Zwecken vorhandenen Glycocolls bestimmt und seine Entstehung im Thierkörper aus α -Amidosäuren und namentlich aus Harnsäure wahrscheinlich gemacht, aus welcher letzterer es ja auch von Strecker mittelst Jodwasserstoffsäure und von Schultzen mittelst concentrirter Schwefelsäure erhalten worden ist. Auch durch andere physiologische Erfahrungen

¹⁾ Ein ausführlicher Litteraturnachweis findet sich am Schluss der Arbeit.

wird die Annahme nahe gelegt, dass das Glycocoll im intermediären Stoffwechsel eine besondere Rolle spielt, denn nach den Untersuchungen von Schultzen und Nencki und denen von Salkowski wird das Glycocoll im Organismus besonders leicht in Harnstoff verwandelt, ebenso wie es im Körper der Vögel nach v. Knieriem in Harnsäure übergeht.

In thierischen Geweben¹⁾ ist das Glycocoll als solches bisher nur ein einziges Mal gefunden worden: N. H. Chittenden untersuchte den Kaumuskel von *Pecten irradians*, einer an den östlichen Küsten der Vereinigten Staaten in grosser Menge gefundenen und auch als Nahrungsmittel geschätzten Kammuschelart. Das wässerige Extract des Muskels wurde durch Kochen, mit oder ohne Essigsäure, enteiweiss, aus der wässerigen Lösung durch das drei- oder vierfache Volumen Alkohol eine reichliche Menge Glycogen niedergeschlagen, das Filtrat mit Bleiacetat versetzt und das Filtrat des entstandenen (anorganischen) Niederschlages, nach Entfernen des Bleies mittelst Schwefelwasserstoffs, bis zur Ausscheidung weniger prismatischer Krystalle eingedampft; die Krystalle schmolzen bei ungefähr 180° C. und wurden durch die Analyse als Glycocoll erkannt; die Ausbeute an demselben betrug 0,39—0,71%.

Auch als Zersetzungsprodukt der Proteide ist bisher das Glycocoll nur selten gefunden worden. Nachdem Braconnot es, wie erwähnt, bei der Spaltung des Leims mit Schwefelsäure entdeckt hatte, fand es Nencki (und später auch dessen Schüler Jeanneret) unter den Produkten der Pankreasfäulniss des Leims und Nencki's Schüler Wälchli auch unter denen des Elastins; ferner konnte es Horbaczewski unter den Spaltungsprodukten der Hornhaut, Krukenberg unter denen des Spongins, Wetzel unter denen des Conchiolins, endlich Th. Weyl unter jenen der Seide nachweisen. In jüngster Zeit endlich ist es Edwin Faust im Schmiedeberg'schen Laboratorium gelungen, aus dem bei halber Sättigung des Pferdeblutserums mit Ammonsulfat ausfallenden Globulinalgemenge durch

¹⁾ Nach den Untersuchungen von Shorey scheint es jedoch ein constanter Bestandtheil des Zuckerrohrs zu sein.

nicht zu schwaches Ansäuern mit Essig- oder Salzsäure und nachheriges längeres Einleiten von Kohlensäure ein Albuminoid, das «Glutolin», darzustellen, welches bei der Zersetzung mit concentrirter Salzsäure Glycocoll lieferte.

Der Umstand, dass, wie wir sahen, das Glycocoll bei der Zersetzung der Eiweissstoffe so selten zur Beobachtung gelangt, kann seinen Grund haben in einem fundamentalen Unterschied, der zwischen den einzelnen Eiweissstoffen besteht, wie dies in der That Hlasiwetz und Habermann, ferner Hoppe-Seyler annahmen, die zwischen «wahren», nicht glycocollliefernden Eiweissstoffen und glycocollliefernden «Albuminoiden» unterschieden. Es muss jedoch diesem auf negativen Beobachtungen beruhenden Schlusse gegenüber darauf hingewiesen werden, dass gerade die Erkennung resp. Reindarstellung des Glycocolls mit besonderen Schwierigkeiten verknüpft ist; zeigte doch Curtius erst 1882, 62 Jahre nach der Entdeckung des Glycocolls, welche Krystallform und welcher Schmelzpunkt ($232-235^{\circ}$, nicht 170° , 178° , 190°) dem reinen Glycocoll, ganz abweichend von früheren Angaben, zukomme.

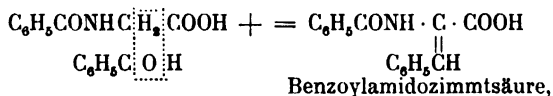
Es war daher als ein grosser Fortschritt dankbar zu begrüssen, als J. Baum in Baumann's Laboratorium zeigte, dass die Ueberführung des Glycocolls in Hippursäure, wie sie im Organismus Statt hat, auch im Reagensglase mit Benzoylchlorid und Natronlauge glatt und quantitativ bewerkstelligt werden kann, die Benzoylirung somit ein expeditives Verfahren zur Charakterisirung und Bestimmung des Glycocolls liefert. Mit Hülfe dieses Verfahrens hat nicht nur Charles S. Fischer und dann Gonnermann die Ausbeute an Glycocoll aus dem Glutin quantitativ bestimmt, sondern auch Faust das Glycocoll als Spaltungsprodukt seines «Glutolins» entdeckt. Immerhin bietet jedoch auch die Erkennung der Hippursäure einige Schwierigkeiten, zumal wenn es sich darum handelt, dieselbe neben grösseren Mengen der bei der Benzoylirung immer auftretenden Benzoessäure zu charakterisiren, wie dies in Bezug auf den Schmelzpunkt auch Wiener jüngst wieder hervorgehoben hat. Ich habe daher, auf den Vorschlag von Herrn Prof. F. Hofmeister, mich nach einem Verfahren umgesehen, welches

die Erkennung der Hippursäure durch Ueberführung in ein charakteristisches Derivat in ähnlicher Weise erleichtert und sicher stellt, wie dies die Phenylhydrazinprobe für den Zucker leistet; ich glaube ein solches Verfahren in der Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd erprobt zu haben, die von E. Erlenmeyer jun. in einer Reihe wichtiger Abhandlungen studirt worden ist, und dessen Angaben ich im Weiteren gefolgt bin.

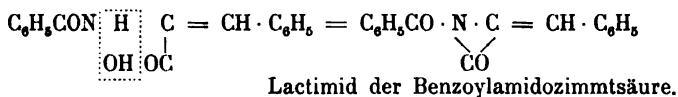
II.

Setzt man zu einer Lösung von 1 Mol.-Gew. Hippursäure in 3 Mol.-Gew. Essigsäureanhydrid und 1 Mol.-Gew. geschmolzenen essigsauren Natrons 1 Mol.-Gew. Benzaldehyd, so färbt sich die Flüssigkeit beim Erwärmen alsbald gelblich, allmählich immer mehr dunkelgelb, und bei längerem Erwärmen ($\frac{1}{2}$ Stunde) im Wasserbade oder beim Abkühlen erstarrt alsbald die ganze Masse zu einem Krystallbrei, der aus netzartig durcheinander gelagerten oder wawellitähnlich angeordneten Nadelchen besteht, die schwach gelblich gefärbt sind. Da der Körper in kaltem Alkohol und Aether nur schwer löslich ist, kann er von anhaftendem Bittermandelöl durch Waschen mit Alkohol leicht befreit und durch Krystallisation aus heissem Alkohol oder Benzol leicht gereinigt werden. Er schmilzt bei 165—166° C.

Nach den Untersuchungen von Erlenmeyer entsteht der Körper, indem sich zunächst die Hippursäure mit Benzaldehyd zur Benzoylamidozimmtsäure condensirt:



und aus der gebildeten Benzoylamidozimmtsäure durch weiteren Austritt eines Moleküls Wasser ein Lactimid entsteht:



Die Reaction verläuft in annähernd quantitativer Weise, da bis 80% des Ausgangsmaterials als « Lactimid » gewonnen

werden konnten; Versuche, die Ausbeute zu einer absolut quantitativen zu gestalten, verliefen ergebnisslos, da bei der Condensation das Lactimid nicht das einzige Reactionsprodukt ist, sondern neben diesem stets auch das Natronsalz der Benzoylamidozimmtsäure in nicht unerheblicher Quantität entsteht. Die leichte Bildung der Benzoylamidozimmtsäure aus ihrem Lactimid gestattet nun, in ausserordentlich bequemer Weise letzteres noch weiter zu charakterisiren: Kocht man das Lactimid mit verdünnter Natronlauge vorsichtig auf (zu starkes Erwärmen oder concentrirtere Natronlauge ist wegen der unten zu besprechenden Bildung von Phenylbrenztraubensäure zu vermeiden), so löst sich alsbald das Lactimid auf; die (eventuell filtrirte) Lösung wird heiss mit Säure versetzt, worauf sich alsbald, eventuell nach dem Reiben mit einem Glasstabe, ein krystallinischer Niederschlag abscheidet, der aus Alkohol in prachtvollen, wasserhellen Prismen erhalten werden kann, und dessen Schmelzpunkt interessanter Weise höher als der des Lactimids liegt, nämlich bei 225° C.

Die so dargestellte Säure, die Benzoylamidozimmtsäure, die somit das erste Condensationsprodukt der Hippursäure mit Benzaldehyd darstellt, ist zuerst von Plöchl erhalten, jedoch erst von Erlenmeyer in ihrer Constitution aufgeklärt worden, indem es letzterem gelang, sie mittelst Mineralsäuren oder Alkalien in Benamid und Phenylbrenztraubensäure zu spalten:

$$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{CONH} \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{CH} : \text{C} \text{ COOH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{OH} \end{array} = \text{C}_6\text{H}_5 \text{ CO NH}_2 + \text{C}_6\text{H}_5\text{CH} : \text{C}(\text{OH}) \cdot \text{COOH} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$$

Da die Phenylbrenztraubensäure sowohl mit Eisenchlorid als auch mit Phenylhydrazin in charakteristischer Weise reagirt, so eignen sich diese Reactionen auch zur Erkennung der Hippursäure, zumal die Phenylbrenztraubensäure direkt aus dem Lactimid erhalten werden kann und die intermediäre Darstellung der Benzoylamidozimmtsäure vollkommen entbehrlich ist. Man verfährt, um das Lactimid an seiner Ueberführbarkeit in die Phenylbrenztraubensäure zu erkennen, nach Erlenmeyer am besten in der Art, dass man das Lactimid mit starker Natronlauge erhitzt, bis das Auftreten von Ammoniak (das aus abgespaltenem Benamid entsteht) deutlich nachweisbar ist, und

darauf ansäuert, wobei sich die Phenylbrenztraubensäure als etwas gefärbter Klumpen abscheidet, der beim Schütteln mit Aether ausserordentlich leicht in diesen übergeht. Mit der abgehobenen ätherischen Lösung stellt man nun folgende zwei Reactionen an: der eine Theil wird direkt mit verdünntem Eisenchlorid versetzt; die wässrige Schicht färbt sich beim Schütteln sofort tief dunkelgrün, welche Färbung allmählich einem charakteristischen Gelb Platz macht; der andere Theil der ätherischen Lösung der Phenylbrenztraubensäure wird mit einer ätherischen Lösung von Phenylhydrazin versetzt, es scheidet sich alsbald das Hydrazon der Phenylbrenztraubensäure ab, das nach dem Waschen mit Aether durch seinen Schmelzpunkt (161° C.) erkannt werden kann.

Wie man sieht, erhält man bei der Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd eine Reihe charakteristischer und leicht fassbarer Produkte: zunächst das Lactimid, das durch Schmelzpunkt und Krystallform wohl charakterisirt, wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser, Alkohol und Aether leicht rein erhalten werden kann, dann durch Hydratation und Spaltung aus dem Lactimid die Benzoylamidozimmtsäure und die Phenylbrenztraubensäure, beide ebenfalls leicht krystallisirt zu erhalten, von denen ferner noch die letztere auch in kleinen Mengen leicht erkennbare charakteristische Reactionen liefert.

Die Empfindlichkeit der Reaction ist eine für die meisten Fälle wohl ausreichende: 5 mg Hippursäure in Essigsäureanhydrid gelöst ergaben bei der Condensation mit Benzaldehyd noch deutliche Lactimidkrystalle und ebenso konnte noch 1 cg Hippursäure zu 10 cem. Blut zugesetzt, nachgewiesen werden. Ueber den Nachweis unter den Spaltungsprodukten der Eiweisskörper finden sich weiter unten die näheren Angaben.

Es lag endlich noch die Möglichkeit vor, zur Condensation mit Benzaldehyd nicht die Hippursäure, sondern, unter Vermeidung der mit mannigfachen Uebelständen verknüpften Benzoylirung, das Glycocoll selbst oder die Acetursäure zu verwenden. Von den beiden zur Verfügung stehenden, ebenfalls von E. Erlenmeyer ausgearbeiteten Verfahren liefert jedoch das eine, bei dem Essigsäureanhydrid als Condensationsmittel angewandt wird, ein in wässriger Lösung, namentlich bei Gegenwart von Alkalien, unbeständiges Lactimid, während das andere,

bei dem Natronlauge als Condensationsmittel dient, kein für das Glycocolle allein charakteristisches Produkt liefert, da das entstehende Diphenyloxäthylamin aus allen α -Amidosäuren (Leucin, Tyrosin etc.) erhalten werden kann.

An Stelle des Benzaldehyds können eventuell auch andere Aldehyde oder Phtalsäureanhydrid zur Condensation verwendet werden, doch besitzt, nach Versuchen von mir, das Lactimid aus Benzaldehyd bei Weitem am besten die für den vorliegenden Zweck erwünschten Eigenschaften.

III.

Mit Hilfe der genannten Reaction auf Hippursäure wurden zunächst Versuche angestellt, um über die Synthese der Hippursäure im thierischen Organismus weitere Aufklärung zu erhalten. Seitdem es Bunge und Schmiedeberg in ihrer berühmten Arbeit gelang, diese älteste bekannte vitale Synthese in der überlebenden, durchbluteten Hundeniere nachzuahmen, hat es an Versuchen, diesen Vorgang unabhängig von überlebendem Gewebe, wie die Verdauungs- oder Oxydationserscheinungen, zu erzielen, nicht gefehlt (Kochs, J. Munk u. A.), doch stets mit negativem Erfolg. Auf Grund der gefundenen neuen Methode für Erkennung der Hippursäure und namentlich in der Hoffnung, dass die Zermalmung der Zellen mit scharfem Quarzsand und starkes Pressen, wie es selbst das lang gesuchte Enzym der Hefezelle zugänglich gemacht hat, auch aus der Nierenzelle die synthetischen Fermente gewinnen lassen würde, hat Herr Fränk Schultz im Winter 97/98 auf Veranlassung von Herrn Prof. Hofmeister diesbezügliche Versuche angestellt. Trotzdem uns für dieselben durch die Freundlichkeit von Herrn Prof. J. Forster die grosse Presse des hygienisch-bacteriologischen Instituts zur Verfügung stand, verliefen unsere mannigfach variirten Versuche, über die Herr Schultz in seiner Dissertation berichten wird, was die Synthese der Hippursäure aus Benzoessäure anlangt, durchaus negativ. Wohl aber gelang es uns, das von Schmiedeberg entdeckte Histozytm, das die Spaltung der Hippursäure in Benzoessäure und Glycocolle bewirkt, mit Hilfe der Presse aus den Nieren verschiedener Thierarten zu gewinnen.

Es mag gestattet sein, hier anzufügen, dass auch Versuche, die von Hofmeister entdeckte Methylierung des Selens

und Fenchols im Organismus mit Extracten von Fischmoleculen zu erhalten, stets negative Resultate lieferten. Wenn es erlaubt ist, auf Grund negativer Resultate Schlussfolgerungen zu ziehen, da die Methodik für die Versuche immerhin eine im übrigen erprobte und ausgefeilte genannt werden darf, so scheint es synthetische Fermente im Organismus nicht zu geben, die Synthesen im Körper scheinen vielmehr, wie dies schon Hofmeister hervorgehoben hat, nicht rein chemische Vorgänge zu sein, sondern im überlebenden Gewebe sich abspielende Processe, für die ein Zwischenvorgang nothwendig ist, der seinerseits davon abhängig ist, dass andere Zellfunctionen erhalten geblieben sind.

IV.

Zu den Untersuchungen über das Vorkommen von Glycocoll unter den Spaltungsprodukten des Eiweissmoleküls wurden zunächst die Eiweisskörper des Blutes herangezogen, da dieselben am leichtesten in grösserer Menge und in annähernd reinem Zustande gewonnen werden können. Neben dem Serumglobulin, betreffs dessen es mir auch, nach eigenen demnächst zur Veröffentlichung gelangenden Untersuchungen fraglich ist, ob es einen einheitlichen Eiweisskörper darstellt, gelangten zur Prüfung das Fibrin aus Rinderblut, wie es vom Schlachthaus bezogen wird, das jedoch durch tagelanges Auswaschen von Blutfarbstoff befreit war, und ferner, da das Fibrin auch einen positiven Befund gab, reines nach den Vorschriften, die Reye im hiesigen Institut ausgearbeitet hat, durch $\frac{3}{10}$ -Sättigung mit Ammonsulfat dargestelltes Fibrinogen. Versuche mit krystallisirtem Serumalbumin konnten nicht in der erwünschten Weise durchgeführt werden, da uns das kostbare Material an noch nicht in der für diese Versuche nöthigen Menge (20—50 g mindestens für das einzelne Experiment) zur Verfügung stand. Inzwischen ist es im hiesigen Institut (namentlich Herrn Dr. Pemsel) gelungen, ein expeditives Verfahren auszuarbeiten, das gestattet, aus jedem Pferdeblutserum krystallisirtes Albumin darzustellen, so dass die Versuche eventuell demnächst wieder aufgenommen werden sollen. Um jedoch die Versuche an einem

einwandfreien, krystallisirten Eiweisskörper zu bestätigen, wurden noch Versuche an krystallisirtem Hämoglobin gemacht, das nach dem Ammonsulfatverfahren dargestellt wurde, welches Herr Dr. C. Micko aus Graz im hiesigen Institute während des letzten Winters in nachfolgende zweckmässige Form gebracht hat.

Blutkörperchenbrei (meist durch Absitzenlassen von Pferdeoxalatblut gewonnen) wird mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünnt und im Eiskasten oder durch Eintragen von gewogenen Eisstücken gekühlt. Nach dem Abkühlen wird die Flüssigkeit mit Aether (auf 1 Liter 50—70 ccm. Aether) gut durchgerührt, sodann mit ebenfalls gekühlter gesättigter Ammonsulfatlösung, und zwar auf 1 Liter Flüssigkeit 700 ccm. Ammonsulfatlösung, unter fortwährendem Umrühren nach und nach vermischt. Nach 5 bis 15 Minuten beginnt der entstandene voluminöse Niederschlag sich zu heben; tritt dies nicht ein, so muss noch etwas Aether vorsichtig zugefügt werden, doch ist ein grosser Ueberschuss von Aether zu vermeiden, da dann ein grosser Theil des Hämoglobins mit ausgefällt wird. Nach mehreren Stunden oder auch früher hat sich an der Oberfläche ein blassrother Niederschlag gebildet, während die darunter befindliche Flüssigkeitsschicht klar und dunkelgranatroth erscheint. Die letztere wird abgehoben und auf kalte Papierfilter gebracht. Die Filtration geht gut von Statten; Kellertemperatur im Winter (ev. Eisschrank) genügt, um eine vorzeitige Krystallisation zu verhindern; selbst nach zwei Tagen entsteht unter diesen Verhältnissen nur ein ganz unbedeutender Niederschlag. Der erwähnte oben aufschwimmende Niederschlag wird separat auf Filter gebracht, er enthält nur eine verschwindend kleine Menge auskrystallisirten Hämoglobins. Die Filtrate, die nahezu sämtliches Hämoglobin gelöst enthalten, werden in grosse Porcellanschalen gegossen und bei Zimmertemperatur unter zeitweisem Umrühren stehen gelassen. Das Hämoglobin scheidet sich in anfangs rothen, später bräunlichen Krystallen aus. Nach drei Tagen ist fast das ganze Hämoglobin auskrystallisirt, so dass die Filtrate nur schwach bräunlich gefärbt erscheinen. Mikroskopisch untersucht enthält es nur spärliche Verunreinigungen, die eventuell durch Umkrystallisiren entfernt werden können. Das gesammelte Hämoglobin wird zweckmässig auf Büchner'schen Filtern bis zur Bildung fester Kuchen abgesaugt. Zum Umkrystallisiren wird das Hämoglobin in möglichst wenig Wasser gelöst und mit Ammonsulfat, und zwar auf 100 ccm. Hämoglobininlösung 80 ccm. gesättigter Ammonsulfatlösung, versetzt. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Aus 5 Liter Pferdeblut waren von diesem scharf abgepressten Hämoglobin gegen 1500 g erhalten.

Für die Zersetzung der Eiweisskörper wurde zuerst nach dem erprobten Verfahren von Hlasiwetz und Habermann

concentrirte Salzsäure unter Zusatz von nicht zu wenig Zinnchlorür verwendet und in der bekannten Weise weiter verarbeitet, später bin ich jedoch zur Zersetzung mit Schwefelsäure übergegangen, da dieses Verfahren, wie schon Gonnermann hervorhebt, den Vortheil hat, dass die Schwefelsäure in einfacher und billiger Weise durch Bleicarbonat entfernt werden kann. Die Zersetzung mit Schwefelsäure gestaltet sich namentlich dann zu einer sehr einfachen Procedur, wenn man dieselbe im Papin'schen Topf bei 130° C. und 4 Atmosphären Druck vornimmt. Um die Braunfärbung der Zersetzungsprodukte zu vermeiden, thut man gut, das Ventil bei ca. 100° C. zu öffnen und die Luft heraus zu lassen. Immerhin gelingt es bei einer Reihe von Körpern (namentlich denen, die eine aromatische Gruppe enthalten) auch auf diesem Wege nicht, zu einer Flüssigkeit zu gelangen, die farblos genug wäre, dass man mit derselben die Biuretreaction anstellen könnte; in diesem Falle empfiehlt es sich, nach Ausfällung der Schwefelsäure am Filtrat sich ein Urtheil zu bilden, ob die Zersetzung bereits vollendet ist. Für die weitere Verarbeitung auf Glycocoll sind jedoch die entstandenen gefärbten Produkte (Schmiedberg's Melanoidinsäure) nicht weiter störend, da das nach der Fällung der Schwefelsäure mit Bleicarbonat verbleibende Filtrat gar nicht oder nur schwach hellgelb gefärbt ist.

In einer Anzahl von Fällen habe ich aus dieser vom Bleisulfat (resp. Bleicarbonat) abfiltrirten neutralen Flüssigkeit die Diaminosäuren durch Ausfällen mit Phosphorwolframsäure in saurer Lösung entfernt; das Verfahren empfiehlt sich namentlich dann, wenn man auf reine Hippursäure ausgeht, doch ist es für die Anstellung der Lactimidprobe durchaus nicht nothwendig, namentlich nicht bei jenen Körpern, die das Glycocoll in ihrem Molekül in grösserer Quantität enthalten. Vor der Weiterverarbeitung mit Benzoylchlorid muss selbstverständlich die überschüssige Phosphorwolframsäure durch Kochen mit Barythydrat, das überschüssige Barythydrat durch Einleiten von Kohlensäure entfernt werden.

Das Filtrat vom Bleiniederschlage ist unter allen Umständen stark einzudampfen, nicht nur weil man auf diesem Wege eventuell reichliche Mengen Tyrosin fortschaffen kann, sondern weil es sich auch empfiehlt, die Benzoylirung — in erster Linie eine additionelle Reaction zwischen der Amino-

gruppe und dem Benzoylchlorid — in möglichst concentrirter Lösung vorzunehmen. Trotz mannigfacher Variationen ist es mir nicht gelungen, eine Methode auszuarbeiten, die stets die gleiche maximale Ausbeute an benzoylirtem Produkt gewährleistet; gerade diese Schwierigkeit complicirt in unserm Verfahren mehr als irgend eine andere die Erkennung des Glycocolls; unter allen Umständen ist jedoch die Anwesenheit eines grösseren Ueberschusses an Alkali zu vermeiden.

Zur Extraction der gebildeten Hippursäure erscheint der von Bunge und Schmiedeberg zuerst empfohlene Essigäther bei weitem am besten geeignet; das Extract ist, wie ebenfalls diese Autoren schon angegeben haben, wiederholt zur Entfernung anhaftenden Farbstoffes zu waschen und der überschüssige Essigäther am besten bei einer Temperatur nicht über 50° C. und unter Vermeidung saurer Reaction abzdampfen. Will man das Extract mit Petroläther, ähnlich wie es Bunge und Schmiedeberg gethan haben, fällen, so muss dasselbe vorher völlig getrocknet sein, wozu ich meist geschmolzenes Glaubersalz verwendete. Fischer empfiehlt zur Fällung der Hippursäure Chloroform, Gonnermann 100 ccm. Chloroform, welchem 5 ccm. Benzol zugefügt sind; die anfänglich klare, rothgelbe Flüssigkeit soll sich rasch trüben und allmählich ein weisses Pulver ausfallen lassen, das nach 24 Stunden auf einem Saugfilter gesammelt werden kann. Ich habe nach diesem Verfahren auch aus Proben, in denen die Lactimidprobe die Anwesenheit von Hippursäure unzweifelhaft darthat, offenbar wegen öligcr Beimengungen, die die Säure in Lösung hielten, ein negatives Resultat erhalten. Da diese Verunreinigungen eventuell auch die Krystallisation des Lactimids hinderten, habe ich meist den Essigätherauszug in Soda gelöst, mit viel Thierkohle ausgekocht, filtrirt, das klare Filtrat angesäuert und bei schwach saurer Reaction und niedriger Temperatur eingedampft, zumal die Lactimidbildung durch Anwesenheit von Salzen gar nicht gestört wird.

Für die Ausführung der Lactimidprobe muss endlich der zu untersuchende Rückstand gut getrocknet und das essigsaure Natron in üblicher Weise durch zweimaliges Schmelzen von

Wasser befreit sein. Was den Zusatz von Benzaldehyd anlangt, so muss sehr vorsichtig zu Werke gegangen werden: zwar kann eventuell überschüssig zugesetzter Benzaldehyd, der als Lösungsmittel für das Lactimid dienen und so dessen Krystallisation hindern kann, durch Destillation mit Wasserdampf entfernt werden, immerhin ist auch aus dem Grunde vor einem Ueberschuss an Benzaldehyd zu warnen, weil beim Schmelzen mit condensirenden Agentien leicht aus Benzaldehyd Produkte entstehen, die nur sehr schwierig zu entfernen sind. Die Condensation selbst wird durch halbstündiges Erhitzen auf dem Wasserbade vorgenommen. Sobald dieselbe vollendet erscheint, wird zu dem Condensationsprodukt Wasser hinzugegossen, gelinde erwärmt, die Lösung der Essigsäure und des essigsauren Natrons abgegossen, das ausgeschiedene Oel in Alkohol heiss gelöst und langsam erkalten gelassen. Um die für die Krystallisation des Lactimids nöthige Alkoholmenge zu ermitteln, ist einiger Aufwand von Geduld nöthig, da so viel Alkohol genommen werden muss, dass die Oele gelöst bleiben, das Lactimid aber sich ausscheiden kann. Es hat gar keinen Zweck, die Abscheidung des Lactimids durch Wasserzusatz zu beschleunigen, man erhält im Gegentheil bei Anwendung eines Ueberschusses von Alkohol, den man ganz langsam verdunsten lässt, die besten Resultate.

Auf diesem Wege ist es mir nun gelungen, aus den oben genannten Eiweisskörpern, dem Fibrinogen, dem Fibrin, dem Globulin und dem Hämoglobin das Lactimid der Benzoylamidozimmtsäure zu erhalten und damit die Anwesenheit des Glycocolls in jenen Eiweisskörpern darzuthun. Ich bin jedoch selbst um so mehr davon entfernt anzunehmen, dass das Glycocoll ein für den Aufbau eines jeden Protein-stoffs wichtige Verbindung sei, als erstens die erhaltenen Quantitäten nur recht geringe waren, ferner auch, wie mich weitere Untersuchungen schon gelehrt haben, nicht aus jedem Eiweisskörper dieses charakteristische Derivat des Glycocolls dargestellt werden kann.

Mit Rücksicht auf die Untersuchungen von W. Hausmann über die Vertheilung des Stickstoffs im Molekül der Eiweiss-

körper habe ich auch das Casein in den Kreis meiner Untersuchungen gezogen, da dasselbe in der Reihe der Proteide gewissermassen am anderen Ende steht, als das so glycocollreiche Glutin. In der That habe ich nun aus dem Casein trotz wiederholter Bemühungen keine Spur des Lactimids erhalten, ein negatives, und darum anscheinend minder beweiskräftiges Resultat, das jedoch durch die im folgenden Abschnitt mitgetheilten Erfahrungen an Hetero- und Protalbumose eine gewisse Stütze erhalten hat.

V.

Die Hetero- und Protalbumose des Fibrins, die primären Albumosen im Sinne W. Kühne's sind neuerdings aus dem Witte-Pepton durch E. P. Pick zugänglicher gemacht worden, der dieselben durch halbe Sättigung mit Ammonsulfat auszufällen und durch Alkohol trennen gelehrt hat.

Indem ich bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens und der bei dem Studium der Albumosen erhaltenen Resultate auf die demnächst erscheinende Arbeit von Pick verweise, möchte ich hier nur hervorheben, dass eine Reihe von Eigenschaften namentlich die Vertheilung des Stickstoffs im Molekül, das Fehlen der Kohlehydrat- und Tyrosingruppe, die reichliche Ausbeute an Leucin und an Diaminosäuren eine Aehnlichkeit der Heteroalbumose mit dem Leim hervortreten liessen, die eine Untersuchung dieser Albumose auf das Vorkommen von Glycocoll erwünscht erscheinen liessen. Das Material zu diesen und den folgenden Untersuchungen war mir zu einem Theile von meinem Freunde Dr. Pick zur Verfügung gestellt, zu andern Theile von mir aus Witte-Pepton dargestellt und gereinigt worden. Die Zersetzung der Heteroalbumose unter Druck und Schwefelsäure geht ausserordentlich schnell von Statte auch fiel es auf, dass fast gar keine Dunkelfärbung der Flüssigkeit eintrat: die weiter in der oben dargestellten Weise geführte Untersuchung auf Glycocoll ergab eine relativ sehr reichliche Ausbeute, so dass, da relativ grössere Mengen in Arbeit genommen waren, die erhaltenen Lactimidproben, einzeln identifizirt werden konnten.

Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in einer mehrmals aus Alkohol umkrystallisirten Probe ergab:

0,1466 g Substanz gaben 0,101 g NH_3 = 0,0832 g N.

Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Gefunden:

5,6% N.

5,7% N.

Der Schmelzpunkt zweier verschiedener Proben ergab für die eine 164°C. , für die andere 166°C. , aus der einen Probe wurde durch vorsichtiges Erwärmen mit verdünnter Natronlauge Benzoylamidozimmtsäure vom Schmelzpunkt 225°C. erhalten, während die andere beim stärkeren Erwärmen mit concentrirter Natronlauge Phenylbrenztraubensäure gab, die mit der Eisenchloridreaction und ätherischer Phenylhydrazinlösung als solche erkannt wurde.

Es erscheint also mit Sicherheit nachgewiesen, dass das Glycocoll ein Spaltungsprodukt der Heteroalbumose des Fibrins darstellt.

Es erschien nun von besonderem Interesse, mit Rücksicht auf die Arbeit E. P. Pick's auch die Protalbumose auf Glycocoll auftreten bei der Spaltung zu untersuchen, da dieselbe von der Heteroalbumose in Bezug auf die constituirenden Elementargruppen sehr erheblich abweicht. Dies ist auch bei der Spaltung mit Schwefelsäure sofort zu erkennen, da eine starke Bräunung der Flüssigkeit selbst beim Arbeiten im Papin'schen Topfe nicht vermieden werden konnte. Gross war hierbei die Ausbeute an Tyrosin, wenn der Bleiniederschlag sehr oft mit heissem Wasser ausgewaschen wurde; das beim Eindampfen sich ausscheidende stark gefärbte Produkt konnte nach dem Umkrystallisiren aus ammoniakalischem Alkohol (Huppert) leicht als Tyrosin erkannt werden. Von Glycocoll resp. dem Lactimid konnten jedoch trotz aller Mühe, und trotzdem grössere zu diesem Zweck dargestellte Quantitäten Protalbumose genau wie die Heteroalbumose verarbeitet wurden, nicht einmal Spuren gewonnen werden.

Wenn ich es wage, auf dieses negative Ergebniss hin Schlüsse zu ziehen, so bin ich mir wohl bewusst, mit welcher Reserve dies zu geschehen hat; immerhin möchte ich es nicht für einen Zufall ansehen, dass gerade bei der Protalbumose

und beim Casein kein Glycocoll gefunden wurde, denn gerade das Casein ist nach den Untersuchungen von F. Alexander dadurch besonders charakterisirt, dass unter seinen peptischen Verdauungsprodukten mittelst der Ammonsulfat-Alkoholmethode nur Protalbumose und keine Heteroalbumose gefunden werden konnte. Leider ist es nicht möglich, gewissermassen die Probe aufs Exempel zu machen und zu sehen, ob andererseits unter den Verdauungsprodukten des Leims ebenso die Heteroalbumose überwiegt, da nach Untersuchungen, die ich mit Herrn cand. med. Paul Zahn angestellt habe, aus dem Leim überhaupt keine eigentlichen primären Albumosen zu erhalten sind.

In der Heteroalbumose ist jedenfalls neben Leucin das Glycocoll in der überwiegenden Menge vorhanden, so wie in der Protalbumose das Tyrosin: da nun ferner nach den oben besprochenen Versuchen das Glycocoll auch in zahlreichen echten Eiweisskörpern, nicht nur den Albuminoiden, vorkommt, so ist mithin das Glycocoll den anderen α -Amidosäuren gleich zu setzen und auch als eine Elementargruppe anzusehen, die für einzelne Eiweisskörper charakteristisch ist.

Aehnliche Ueberlegungen gelten für die Indol liefernde Gruppe, die früher auch als nur den echten Eiweissstoffen zukommend angesehen wurde.

Wenn das Glycocoll freilich in einzelnen Proteinen nur in sehr geringer Menge, in anderen gar nicht vorkommt, so unterscheidet dies die Amidoessigsäure nicht von anderen Amidosäuren: denn auch das leicht nachweisbare Tyrosin ist in einigen Körpern nur in geringer Menge — im Hemiprotein z. B. nur bei der Säurespaltung — in anderen, der Limpricht'schen Protsäure und im Leim, überhaupt nicht nachzuweisen: da die meisten Eiweisskörper stets dieselben Spaltungsprodukte liefern, scheint ja gerade das wechselnde Verhältniss, in dem die einzelnen Elementarbestandtheile zusammengefügt sind, die grosse Mannigfaltigkeit der bekannten Proteinstoffe zu erklären.

In wie weit das in den Eiweisskörpern nachgewiesene Glycocoll auch quantitativ zur Bildung des im Körper als Glycocholsäure oder Hippursäure erscheinenden ausreicht, in wie weit es ferner als intermediäres Produkt bei der Harnstoff-

bildung fungirt, lässt sich auf Grund der obigen Methoden, die keine quantitativen sind, nicht entscheiden. Wenn auch die Ausbeute an Glycocolle aus der Heteroalbumose immerhin eine recht reichliche ist, so möge doch diesbezüglich ausdrücklich auf die Arbeit von Wiener hingewiesen werden, die ein Entstehen von Glycocolle (aus Leucin, aus Harnsäure) im Thierkörper wahrscheinlich gemacht hat. Auch an eine Synthese im Organismus aus den bei der Bildung anderer Körper nachgewiesenen Resten — $\text{CH}_3 \cdot \text{COOH}$ (Jaffé und Cohn, Tappeiner) und NH_2 — (R. Cohn) wäre zu denken. Doch ist eine Entscheidung dieser beim Studium des Glycocolles sich aufdrängenden Fragen so lange nicht zu erwarten, bis nicht der Mechanismus der Umwandlung des Glycocolles zu Harnstoff genügend aufgeklärt ist.

Litteratur-Nachweis.

1) Alexander F. Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Diese Zeitschr. Bd. XXV, S. 411. 1898.

2) J. Baum. Eine einfache Methode zur künstlichen Darstellung von Hippursäure und ähnlich zusammengesetzten Verbindungen. Diese Zeitschr., Bd. IX, S. 465, 1885.

3) Braconnot. Ann. chim.-phys. (2.) Bd. XIII, S. 114, 1820.

4) Bunge G. und Schmiedeberg O. Ueber die Bildung der Hippursäure. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. Bd. VI, S. 233, 1876.

5) Chittenden N. H. Ueber Glycogen und Glycocolle in den Muskeln von Pecten irradians. Liebig's Annalen, Bd. 178, S. 266, 1875.

6) Cohn R. Ueber das Auftreten von Benzamid im Harn nach Darreichung von Benzaldehyd. Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 203, 1890.

7) Curtius Th. Ueber einige neue, der Hippursäure analog constituirte, synthetisch dargestellte Verbindungen. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 26, S. 155, 1882.

8) Dessaignes. Ueber Hippursäure, Benzoesäure u. Leimzucker. Liebig's Annalen, Bd. 58, S. 322, 1846.

9) Erlenmeyer E. jr. 1) Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd. Liebig's Annalen, Bd. 271, S. 37, Bd. 275, S. 1, Bd. 307; 2) Condensation von Glycocolle mit Benzaldehyd a) durch Natronlauge: Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXV, S. 3445; Liebig's Annalen, Bd. 284, S. 36; Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXVIII, S. 1866, Bd. XXIX, S. 295, Bd. XXX, S. 1524 u. S. 1527, Bd. XXX, S. 2896;

Liebig's Annalen, Bd. 307; b) durch Essigsäureanhydrid: Liebig's Annalen, Bd. 284, S. 48.

10) Faust Edwin S. Ueber das Glutolin, ein Albuminoid des Blutserums. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 41, S. 307, 1898.

11) Fischer Ch. S. Ueber die quantitative Bestimmung des Glycocolls in den Zersetzungsprodukten der Gelatine. Diese Zeitschr., Bd. XIX, S. 164, 1894.

12) Gonnermann M. Zur quantitativen Bestimmung des Glycocolls durch Ueberführung in Hippursäure. Pflüger's Archiv, Bd. 59, S. 42 (bei O. Nasse), 1894.

13) Hausmann W. Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 95, 1899.

14) Hlasiwetz H. u. Habermann J. Ueber die Proteinstoffe, erste Abhandlung, Liebig's Annalen, Bd. 159, S. 304, 1871, zweite Abhandlung, ebenda, Bd. 169, S. 150, 1874.

15) Hofmeister Frz. Ueber Methylierung im Thierkörper, Archiv für exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXXIII, S. 198, 1894.

16) Hoppe-Seyler F. Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse. 6. Aufl. (mit H. Thierfelder), Berlin 1893, S. 238 u. S. 271.

17) Horbaczewski J. Ueber die durch Einwirkung von Salzsäure aus den Albuminoiden entstehenden Zersetzungsprodukte. Sitzungsberichte d. Kais. Acad. d. Wissensch., Bd. 80, 2. Abth., Juniheft 1879: Wiener Monatshefte, Bd. VI, S. 639, 1885.

18) Jaffé M. und Cohn R. Ueber das Verhalten des Furfurols im thierischen Organismus. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XX, S. 2311, 1887.

19) Jeanneret J. Untersuchungen über die Zersetzung von Gelatine und Eiweiss durch die geformten Pankreasfermente bei Luftabschluss (Diss. bei Nencki-Bern). Journ. f. prakt. Chem., Bd. XV, S. 353, 1877.

20) v. Knieriem W. Verhalten der im Säugethierkörper als Vorstufen des Harnstoffs erkannten Verbindungen zum Organismus der Hühner. Zeitschr. f. Biologie, Bd. XIII, S. 36, 1877.

21) Kochs W. Ueber eine Methode zur Bestimmung der Topographie des Chemismus im Thierkörper, Pflüger's Archiv, Bd. XX, S. 64, 1879.

22) Krukenberg C. W. F. Fortgesetzte Untersuchungen über die Skeletine, Zeitschr. f. Biologie, Bd. VI, S. 254, 1886.

23) Limpricht H. Vorläufige Notiz über einige Bestandtheile der Fleischflüssigkeit, Liebig's Annalen, Bd. 127, S. 185, 1863 und über einige Bestandtheile der Fleischflüssigkeit, ebenda, Bd. 133, S. 293, 1864.

24) Munk J. Zur Lehre von den secretorischen und synthetischen Processen in der Niere, Virchow's Archiv, Bd. 107, S. 291, 1887.

25) Nencki M. Ueber die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe.

und über die Pankreasverdauung. Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. VII, S. 1593, 1874.

26) Plüchl J. Ueber Phenylglycidsäure, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XVI, S. 2815, 1883.

27) Reye W. Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaug. Diss. (bei F. Hofmeister), Strassburg, 1898.

28) Salkowski E. Weitere Beiträge zur Theorie der Harnstoffbildung. Das Verhalten des Glycocoll, Sarkosin und Alanin im thierischen Organismus. Diese Zeitschr., Bd. IV., S. 55 u. S. 101, 1880.

29) Schmiedeberg O. Ueber die Elementarformeln einiger Eiweisskörper, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., B. 39, S. 1, 1897.

30) Schultzen O. u. Filehne W. Ueber die Einwirkung der Schwefelsäure auf Harnsäure, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. I, S. 150, 1868; Schultzen O. u. Nencki M., Ueber die Vorstufen des Harnstoffs im Organismus, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. II, S. 566, 1869.

31) Shorey E. S. Nachträgliche Bemerkungen über das Amid des Zuckerrohrs, Journ. of the Americ. Chem. Soc., Bd. XX, S. 133, 1897, vgl. ibidem, Bd. XIX, S. 881.

32) Strecker. Vorläufige Notiz über die Spaltung der Cholsäure in Glycocoll und stickstofffreie Säure; Liebig's Annalen, Bd. 65, S. 130, 1848; vgl. ferner ebenda Bd. 67, S. 16. — Ueber die Bildung von Glycocoll aus Harnsäure, Liebig's Annalen, Bd. 146, S. 142, 1866.

33) Tappeiner H. Ueber das Verhalten einiger Condensationsprodukte des Chlorals mit Ketonen im Thierkörper, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXXIII, S. 364, 1894.

34) Wälchli G. Ueber Fäulniss von Elastin und Mucin (bei M. Nencki-Bern), Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XVII, S. 71, 1880.

35) Wetzell G. Ueber die Spaltungsprodukte des Conchiolins, Centralblatt f. Physiologie, Bd. XIII, S. 113, 1899.

36) Weyl Th. Zur Kenntniss der Seide I, II. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 21, S. 1407 u. S. 1529, 1888.

37) Wiener H. Ueber das Glycocoll als intermediäres Stoffwechselprodukt, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 40, S. 313, 1898.

=====

Ueber das Melanin der Augenhäute.

Von

Dr. H. Landolt,

I. Assistenten der Augenklinik zu Strassburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 22.)

(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1899.)

Ob die normalen und pathologischen Pigmente, welche gemeinhin als Melanine bezeichnet werden, vom Blutfarbstoff abstammen oder nicht, ist eine noch immer offene Frage. Die histogenetische Untersuchung hat es wahrscheinlich gemacht, dass die Entstehung des Gewebspigmentes im Thierkörper an das Vorhandensein der Blutbahnen gebunden ist.¹⁾ Damit ist aber noch nicht der Nachweis erbracht, dass ein direkter materieller Zusammenhang zwischen Melanin und Blutfarbstoff besteht, denn Blutbahn und Blutfarbstoff können auch auf anderem Wege, zum Beispiel durch Sauerstoffzufuhr, die Melaninbildung einleiten oder begünstigen.

Die chemische Untersuchung hat Nencki²⁾ schon vor langer Zeit dazu geführt, jede chemische Beziehung zwischen melanotischem Pigment und Blutfarbstoff zu läugnen. Später hat Nencki³⁾ dann auf Grund der Untersuchung des Proteinochromogens auf die Beziehungen zwischen dem Skatol liefernden

1) Ehrmann, Das melanotische Pigment u. s. w., Bibliotheca medica, Abth. D, II, H. 6, 1896. Scherl, Einige Untersuchungen über das Pigment des Auges. Graefe's Archiv für Ophthalmologie, 39, II, S. 130.

2) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 20 S. 357.

3) Chemische Berichte, 1895, S. 567.

aromatischen Kern der Eiweisskörper und den thierischen Pigmenten, speciell dem Melanin hingewiesen.

Der Beweis, dass künstlich aus Eiweissstoffen Pigmente von den Eigenschaften der Melanine erhalten werden, ist von Schmiedeberg¹⁾ geführt worden. Dabei ergab sich, dass von den untersuchten pathologischen, normalen und künstlichen Melaninen auch nicht zwei die gleiche Zusammensetzung aufweisen, eine Beobachtung, die durch in gleicher Richtung ausgeführte Untersuchungen an künstlich gewonnenen Melaninen von Chittenden und Albro²⁾ ihre Bestätigung gefunden hat. Worin diese auffallenden Verschiedenheiten begründet sind, lässt sich zur Zeit noch nicht übersehen. Nur so viel ist sicher, dass die Art der Gewinnung auf die Zusammensetzung der isolirten Melanine von grösstem Einfluss ist, und zwar nicht bloss betreffs der künstlich aus Eiweiss erhältlichen, sondern auch der natürlich vorkommenden. — Da nun die Frage nach den genetischen Beziehungen der Melanine zum Eiweiss, beziehentlich zum Hämatin, nur auf Grund genauer chemischer Untersuchung erledigt werden kann, habe ich auf Anregung von Herrn Prof. Hofmeister neuerdings die Untersuchung des Chorioidealpigmentes, als des am besten zugänglichen, normal vorkommenden Melanins, in Angriff genommen.

Hierbei handelte es sich

1. um die Elementarzusammensetzung der möglichst intacten Pigmentkörner,
2. um die Trennung des Farbstoffes von einem etwa vorhandenen Stroma und Untersuchung des isolirten Farbstoffes,
3. um Gewinnung von Spaltungsprodukten oder sonstigen chemischen Derivaten des Melanins, welche Schlüsse auf die Constitution des Pigmentes gestatten könnten.

1) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 39, 1.

2) Americ. Journal of Physiology, Vol. II, 291.

I. Die Elementarzusammensetzung der Pigmentkörnchen.

Entstehen die Pigmentkörner aus dem Blutfarbstoff, so kann man erwarten, dass sie entweder eisenhaltig sind und in ihrer Zusammensetzung die Abstammung vom Haematin erkennen lassen, oder, wenn sie nicht eisenhaltig sind, doch ihrer Zusammensetzung nach dem eisenfreien Hämatin (Hämatoporphyrin) nahe stehen.

Die bisherigen Angaben sind zur Beurtheilung dieser Frage deshalb nicht ganz ausreichend, weil die chemische Untersuchung, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, sich auf Pigment bezog, das zu seiner Darstellung chemisch nicht indifferenten Procedures unterworfen worden war, denn die grösste Schwierigkeit seine Elementarzusammensetzung richtig festzustellen, besteht eben darin, es chemisch unverändert und doch frei von verunreinigenden Beimengungen wie Eiweiss, Gewebs- und Zellresten, Blut u. s. w. zu erhalten.

Der erste, welcher den Farbstoff der Augenhäute untersuchte, war Scherer.¹⁾ Er gewann denselben dadurch, dass er die Chorioidea von den umgebenden Häuten befreite, durch Waschen mit Wasser das Blut entfernte und dann das Pigment mittelst Pinsels von dem Gewebe trennte. Der Farbstoff wurde in Wasser aufgefangen, absitzen gelassen, mit Wasser gewaschen, auf dem Filter gesammelt und zur Reinigung von Fett und anderen Verunreinigungen mit Alkohol und Aether behandelt.

In ähnlicher Weise verfuhr Gmelin,²⁾ nur filtrirte er, um die Membranreste zu entfernen, durch ein Leinwandfilter, wobei der Farbstoff mit hindurchging. Er verdunstete dann die ablaufende Flüssigkeit und kochte den Rückstand mit Alkohol und Aether aus.

N. Sieber³⁾ liess nach dem Filtriren durch ein Lein-

1) Annalen der Chemie und Pharmacie, 40. Bd., 1841, S. 63.

2) Gmelin's Handbuch der organischen Chemie, VIII, 3, S. 2353.

3) N. Sieber, Ueber die Pigmente der Chorioidea und der Haare. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 20, S. 362.

wandfilter das Pigment sich zu Boden setzen und kochte den Bodensatz am Rückflusskühler mit 10%iger Salzsäure, um das beigemengte Eiweiss in lösliche Substanzen zu verwandeln. Danach filtrirte sie, wusch aus und behandelte mit Alkohol und Aether, bis von beiden Flüssigkeiten nichts mehr gelöst wurde.

Rosow¹⁾ behandelte die Pigmentschicht der Chorioidea 3—4 Wochen lang mit concentrirter Essigsäure, wusch dann gründlich aus und trocknete den Rückstand unter der Luftpumpe. Den Rest, d. h. die Augenhäute ohne die Epithelial-schicht der Chorioidea, überliess er eine Woche der Fäulniss, zerrieb ihn dann unter starkem Wasserstrahle auf einem Leinenfilter und behandelte das durchgeflossene Pigment $\frac{1}{4}$ — $\frac{3}{4}$ Stunden mit kochender concentrirter Essigsäure. Nach Auswaschen mit Wasser trocknete er das Pigment wieder unter der Luftpumpe.

Mays²⁾ gewann den Farbstoff der Augenhäute durch Verdauung mit Pankreassaft. Das Pigment blieb unverdaut zurück und wurde mit Wasser gewaschen.

Scherl³⁾ legte die pigmentirten Häute auf 24 Stunden in verdünnte Salpetersäure (1 : 10) und danach in eine schwache Lösung von doppeltkohlensaurem Natron, worin sich das Pigment löste. Auf Zusatz von Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaction fiel der Farbstoff aus der Lösung flockig aus.

Hirschfeld⁴⁾ zerkleinerte die Pigmenthäute des Auges mit der Scheere und behandelte die Fetzen nach öfterem Auswaschen in Wasser mit Alkohol und Aether, danach mit 5%iger kalter Salzsäure. Zur Entfernung der Säure wusch er wieder mit Wasser aus und brachte die Gewebsetsen darauf in 2%ige

¹⁾ Rosow, Ueber das körnige Augenpigment. Archiv für Ophthalmologie, 9 III. S. 63.

²⁾ Mays, Ueber den Eisengehalt des Fuscins. Ebenda 39 III. S. 89.

³⁾ Scherl, loc. cit.

⁴⁾ Hirschfeld, Untersuchungen über die schwarzen Farbstoffe der Chorioidea und verwandte Pigmente. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XIII, S. 407.

Kalilauge, die er auf dem Wasserbade erhitzte. Das Pigment löste sich in der Kalilauge. Er filtrirte und versetzte das Filtrat, in dem der Farbstoff gelöst enthalten war, mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaction, wobei das Pigment in braunschwarzen Flocken ausfiel, die sich zu Boden setzten. Beim Filtriren blieb jetzt das Pigment auf dem Filter zurück, wurde gewaschen, getrocknet und wieder der Extraction mit Alkohol und Aether unterworfen.

Scherer und Gmelin gewannen also das Pigment auf rein mechanischem Wege, Mays durch Verdauung mit Pankreassaft, alle anderen durch Behandlung mit Säuren: Salzsäure, Salpetersäure oder Essigsäure.

Die Frage, ob Eisen im Pigment enthalten sei, beantworteten Scherer, Rosow, Mays im bejahenden Sinne, während Sieber, Scherl, Hirschfeld kein Eisen in ihren Präparaten fanden. Da nun Scherer sein Pigment ohne Säurebehandlung, Rosow durch Behandlung mit concentrirter Essigsäure, die auf den Farbstoff nur wenig einzuwirken scheint, Mays durch tryptische Verdauung gewann, während die Uebrigen Salzsäure und Salpetersäure zur Darstellung benutzten, und da, wie Mays nachgewiesen hat, das Eisen aus dem Pigment durch Säuren (10%ige Salzsäure) leicht ausgezogen werden kann, so lässt sich, worauf auch Scherl schon hingewiesen hat, das Fehlen des Eisens in dem mit Säure behandelten Pigment und der nur geringe Eisengehalt in dem Rosow'schen Präparat nicht zur Widerlegung der positiven Befunde verwerthen.

Schwefel wurde weder von Sieber, noch von Rosow oder Hirschfeld gefunden.

Der Aschegehalt schwankte in den untersuchten Präparaten ungemein. Am meisten fand Scherer, nämlich 9,8%, sehr wenig Rosow, 0,59%, und Hirschfeld, 0,9%. Sieber fand einen Aschegehalt von 2,15%. Die Asche der Präparate von Rosow, Sieber und Hirschfeld bestand zum grössten Theil aus Kieselsäure.

Zum Vergleich der Präparate gebe ich in einer Tabelle das Ergebniss der Elementaranalysen verschiedener Pigmentpräparate, aschefrei berechnet:

	Scherer	Sieber	Rosow
C	58,273 ‰ 58,672 ‰ 57,908 ‰	60,34 ‰ 59,9 ‰	54,29 ‰
H	5,973 ‰ 5,962 ‰ 5,817 ‰	5,02 ‰ 4,61 ‰	5,35 ‰
N	13,768 ‰	10,81 ‰	10,18 ‰
O	21,986 ‰ 21,598 ‰ 22,507 ‰	23,83 ‰ 24,68 ‰	30,18 ‰

Ich wählte zur Darstellung des Augenpigmentes ein Verfahren, das ähnlich dem von Scherer und Gmelin den Farbstoff nur chemisch indifferenten Proceduren unterwarf.

Mehrere hundert Rinderaugen wurden, nachdem sie äusserlich roh von anhängenden Gewebstheilen befreit waren, durch einen ca. 1 cm. hinter dem Hornhautrande verlaufenden Schnitt in 2 Theile getheilt, eine vordere und eine hintere Hälfte. Der hintere Bulbustheil wurde umgestülpt, die Retina mit dem Finger nach dem Sehnerveneintritt zusammengestrichen und hier abgeschnitten. Dann wurde die Chorioidea mit der Pigmentschicht mittelst Pincette vom Rande der Sklera abgelöst. Dem vorderen Bulbustheil wurde gleichfalls alles pigmenthaltige Gewebe wie Iris, Ciliarkörper, Chorioidearesten mit der Pincette entnommen und mit dem vorhergewonnenen Theile der Chorioidea in einem Gefäss mit Wasser aufgefangen.

Nach öfterem Wechseln des Wassers wurde das Pigment mit einer Federfahne von den Augenhäuten in Wasser abgestrichen und so von den Häuten getrennt. Zur Trennung von noch vorhandenen Gewebsetzen wurde nun durch ein Rohseidenfilter filtrirt, durch das das Pigment hindurchging. Um das langsame und unvollständige Absetzen des Pigmentes zu beschleunigen, wurde ein gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung zugesetzt und das Ganze kurz bis auf ca. 80° C. erhitzt.¹⁾ Jetzt ballte sich das Pigment in kleinen Flocken zusammen und setzte sich leicht ab. Der grösste Theil der Flüssigkeit über dem am Boden des Gefässes lagernden Farbstoff konnte abgossen werden, der Rest wurde filtrirt. Das Pigment blieb jetzt auf dem Seidenfilter zurück und wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis das abfliessende Wasser mit Baryumchlorid keinen Niederschlag mehr gab. Darauf wurde das Pigment in der Rohseide längerer Extraction mit Alkohol und Aether im Soxhlet'schen Extractionsapparat unterworfen. Sorgfältig,

¹⁾ Da die Augenhäute vorher gut ausgewässert waren, war nicht zu befürchten, dass dabei eine Coagulation von gelöstem Eiweiss und damit eine Verunreinigung des Präparates zu Stande käme.

ohne Seidenfasern mitzunehmen, vom Filter entfernt, wurde es dann in einer Schale auf dem Sandbade getrocknet und fein zerrieben.

Das so gewonnene Pigment besteht aus einem amorphen Pulver von dunkelbrauner Farbe, gänzlich unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Eisessig, Chloralhydrat. Es hinterlässt beim Verbrennen 1,9% Asche.

Die Asche stellt eine weisse Schmelze dar, die den Boden des Platintigels überzieht. Sie löst sich nicht in Wasser, jedoch leicht in Salzsäure, langsamer in Salpetersäure. Auf Zusatz von Kaliumferrocyanid entsteht momentan deutliche Blaufärbung, später ein Niederschlag. Sie enthält also Eisen. Daneben findet sich Phosphorsäure, aber kein Chlor.

Das Präparat wurde längere Zeit bei 110° C. getrocknet und dann der Elementaranalyse unterzogen.

Dieselbe ergab:¹⁾

C	53,74 %	53,26 %	53,33 %
H	5,301 %	5,17 %	5,26 %
N	12,5 %	12,5 %	12,2 %

Aschefrei berechnet:

C	54,78 %	54,29 %	54,36 %
H	5,40 %	5,27 %	5,37 %
N	12,74 %	12,74 %	12,47 %
O	27,08 %	27,70 %	27,80 %

Nach der von mir eingehaltenen Darstellungsweise musste das von mir analysirte Präparat aus den Pigmentkörnchen in toto, Stroma und Farbstoff, bestehen. Nur das von Scherer dargestellte Präparat war mit ebensowenig eingreifenden Mitteln erhalten und es war darnach zu erwarten, dass meine Analysenzahlen mit jenen Scherer's übereinstimmen würden. Das ist jedoch, wie eine Nebeneinanderstellung der Zahlen zeigt, nicht der Fall.

	Scherer ²⁾	Mittel aus meinen Bestimmungen
C	58,28 %	54,48 %
H	5,92 %	5,35 %
N	13,77 %	12,65 %
O	22,03 %	27,52 %

¹⁾ Die Kohlenstoffbestimmung geschah mit Kupferoxyd und vorgelegter Kupferspirale. — Der Stickstoff wurde nach der Methode von Kjeldahl bestimmt.

²⁾ Im Mittel.

Dieser Widerspruch ist jedoch nur scheinbar, insofern sich beide Präparate wesentlich nur durch den Sauerstoff- resp. Wassergehalt unterscheiden. Das Verhältniss von C : N ist in beiden nahezu identisch, sehr nahe 5 : 1. Auch ist zu beachten, dass der hohe Aschengehalt von Scherer's Präparat (9,8%) die Berechnung des Sauerstoffs sehr unsicher macht.

Es fragt sich nun, ob der gefundene Eisengehalt einen Beweis für die Abstammung des Pigmentes vom Hämatin, beziehungsweise Hämoglobin abgeben kann.

Im Pigment habe ich einen Eisengehalt gefunden, der sicher unter 0,01% bleibt, ein Werth, wie er auch in Geweben, die sicher nichts mit Hämoglobin zu thun haben, erhalten werden kann. Das Hämatin dagegen hat einen Eisengehalt von 8,8%, ja selbst das Hämoglobin mit 0,4% Eisen ist noch viel eisenreicher als das Pigment. Sollte der Farbstoff in engerer Beziehung zum Hämatin oder Hämoglobin stehen, so müsste in ihm jedenfalls der Eisengehalt weit höher sein.

Es wäre weiter ein Zusammenhang zwischen dem Pigment und dem eisenfreien Hämatin, dem Hämatoporphyrin, denkbar, aber schon der oberflächliche Vergleich der Zusammensetzung des Hämatoporphyrins mit der des Pigmentes ergibt das Unstatthafte einer solchen Annahme.

Die Zusammensetzung des Hämatoporphyrins ist bei Zugrundelegung von Nencki's Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$

$$C = 67,1\% \quad H = 6,2\% \quad N = 9,8\% \quad O = 16,8\%.$$

Wie ein Vergleich mit Scherer's oder meinen Analysenwerthen zeigt, ist weder die direkte Zusammensetzung des einen Körpers ähnlich der des anderen, noch kann das Pigment aus dem Hämatoporphyrin durch Sauerstoff- oder Wasseraufnahme hervorgegangen sein, schon weil der Stickstoffgehalt des Pigmentes grösser ist als jener des Hämatoporphyrins.

Der Kohlenstoff steht zum Stickstoff im Hämatoporphyrin in einem Verhältniss von 8 : 1, im Pigment dagegen wie 5 : 1.

Wollte man trotzdem an dem genetischen Zusammenhang von Pigment und Hämatoporphyrin festhalten, so müsste man sich das Pigment aus dem Hämatoporphyrin durch Aufnahme von stickstoffhaltigen oder durch Abspaltung von stickstofffreien Complexen entstanden denken.

Hier ist aber die Zahl der Möglichkeiten so gross, dass ein Eingehen auf dieselben schlechterdings unfruchtbar ist.

Dagegen bleibt die Möglichkeit bestehen, dass das Augenpigment aus der chromogenen Gruppe des Eiweissmoleküls (Nencki) hervorgeht.

In seiner Arbeit über die pankreatischen Verdauungsprodukte des Eiweisses macht Nencki, wie Eingangs erwähnt, auf die Aehnlichkeit der Zusammensetzung aufmerksam, die zwischen dem Proteinochromogen, dem Spaltungsprodukt des Eiweisses, und den thierischen Pigmenten besteht. Er weist ferner darauf hin, dass, wie das Hämatin und Hämatoporphyrin beim Schmelzen mit Kali viel Pyrrol, und das Hämatoporphyrin mit Zinn und Salzsäure reducirt und mit Alkali übersättigt, Skatol entwickelt, so auch das rohe Bromprodukt des Proteinochromogens mit Kali geschmolzen, Pyrrol, Skatol und Indol in reichlicher Menge ergibt. Er schliesst daraus, dass im Eiweiss eine chromogene Gruppe vorhanden ist, die bei der Pankreasverdauung losgelöst wird, und die zum Aufbau des Blutfarbstoffes und der anderen thierischen Pigmente verwendet wird, dass also das Proteinochromogen die Muttersubstanz der thierischen Farbstoffe sei.¹⁾

Leider ist es bis jetzt noch nicht gelungen, das Proteinochromogen, das also anscheinend bei der Pankreasverdauung losgelöst wird, zu isoliren. Nencki's Schüler Beitler theilt ihm vorläufig die Formel zu: $C_{96}H_{119}O_{31}N_{21}S$. Es bleibt jedoch fraglich, ob es sich bei ihm wirklich um ein so hohes Molekulargewicht handelt, wie diese Formel des Schwefelgehaltes wegen anzeigt, oder um ein viel niedrigeres. Beachtenswerth ist aber, dass in der Formel das Atomverhältniss C : N sich wie 4,57 : 1 stellt, also ähnlich wie in dem von Scherer und mir analysirten Pigment.

Aehnliches ergibt sich für die Bromderivate des Proteinochromogens. In Kurajeff's²⁾ rothem Bromkörper stellt sich das

1) Beitler: Ueber das Chloroproteinochrom. Berichte der deutsch. chem. Gesellsch., 31, S. 1604.

2) Kurajeff: Zur Kenntniss der Bromproteinochrome. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVI, S. 501.

Verhältniss C:N wie 5,43:1, in Kurajeff's schwarzem Körper wie 5,1:1. Da in all diesen Fällen ausserdem ein auffallend geringer Wasserstoffgehalt nachgewiesen ist, der auf das Vorhandensein ungesättigter Gruppen hindeutet, so lässt sich auf Grund der Elementarzusammensetzung in der That die Vermuthung nicht von der Hand weisen, dass das Augenpigment von der chromogenen Gruppe des Eiweisses abstammt. Das Pigment müsste danach aus dem Chromogen wesentlich durch Sauerstoffaufnahme hervorgehen. Dass es noch mannichfache andere Momente gibt, welche eine chemische Beziehung des Augenpigmentes zur chromogenen Gruppe des Eiweisses wahrscheinlich machen, soll nach Anstellung von weiteren auf Abbau des Pigmentes gerichteten Versuchen in einer späteren Arbeit zur Sprache kommen.

II. Besitzen die Pigmentkörner ein Stroma oder nicht?

Abel und Davis,¹⁾ die das Pigment der Negerhaut untersuchten, fanden, dass die Farbstoffgranula derselben, zunächst unlöslich in Alkalien, nach Einwirkung von verdünnter Salzsäure ihr Pigment an verdünnte Alkalien abgaben. Bei andauernder Anwendung von Hitze lösten sich die Körner in der alkalischen Flüssigkeit bis auf einen unbedeutenden Rückstand auf. Abel und Davis fanden weiter, dass sie sich aus einem farblosen Substrat, aus dem Pigment und anorganischer Substanz zusammensetzen. Aehnliches war auch beim Augenpigment zu erwarten, und thatsächlich spricht dafür, dass nach der Behandlung mit 5%iger Salzsäure in der Kälte das Pigment sich in Alkali löst und durch Säure wieder auffällbar ist, wie Hirschfeld gezeigt hat.

Dass durch Einwirkung von Säure eine Veränderung eintritt, geht mit Sicherheit aus den Analysen von Sieber hervor, welche ergaben, dass das mit Salzsäure gekochte Rinderaugenpigment kohlenstoffreicher und stickstoffärmer ist, als das nicht mit Säure behandelte. Doch beweist das noch nicht

¹⁾ John C. Abel und W. S. Davis, Ueber das Pigment der Negerhaut und der Haare. Journ. of exp. Medicine, 1, 361.

die Anwesenheit eines Stromas, da eine solche Aenderung der Zusammensetzung auch auf anderem Wege, z. B. durch Abspaltung von Ammoniak und Wasser, denkbar ist.

Es wurden nun verschiedene Versuche vorgenommen, um die Existenz eines aus Eiweiss bestehenden Stromas der Pigmentkörnchen nachzuweisen oder zu widerlegen.

Der Versuch, das Stroma durch Säure- und darauffolgende Alkalibehandlung, wie Abel und Davis gethan hatten, sichtbar zu machen, ergab ein negatives Resultat.

Den Eiweissgehalt des Stromas direkt durch Eiweissreactionen darzuthun, erwies sich wegen der tiefen Eigenfärbung des Pigmentes als unmöglich.

Ein anderer Versuch, das Eiweiss nachzuweisen, ging dahin, das Pigment intensiver Pepsinverdauung zu unterwerfen und die Zusammensetzung des unverdauten Restes festzustellen.

Es wurden die pigmenthaltigen Häute auf dieselbe Art wie oben geschildert, den Augen entnommen. in eine grössere Menge Pepsinsalzsäure ¹⁾ hineingethan und mehrere Tage auf dem Sandbade bei ca. 40° stehen gelassen. In dieser Lösung war innerhalb einiger Tage alles Gewebe verdaut und nur das Pigment blieb am Boden des Gefässes zurück. Dann wurde die Flüssigkeit abgehebert und durch Wasser ersetzt, das nach jedesmaligem Absitzen des Pigmentes mehrmals erneuert wurde, bis eine Probe der klaren Flüssigkeit nach Zusatz von Kalilauge und einigen Tropfen verdünnter Kupfersulfatlösung keine rotviolette Färbung mehr zeigte. Nun wurde das Pigment auf einem Seidenfilter gesammelt und der Alkohol- und Aetherextraction unterworfen, getrocknet und pulverisirt.

Auch dieses Pigmentpräparat stellt wie das auf mechanischem Wege und durch Aussalzen gewonnene ein amorphes braunes Pulver dar, ist aber ein wenig heller in der Farbe als jenes. Es enthält 1,4% Asche. Diese stellt gleichfalls eine weisse Schmelze dar, die dieselben Reactionen zeigt, wie die Asche des ersten Präparates. Sie enthält gleichfalls Eisen, doch in noch geringerer Menge.

Die Elementaranalyse (wie oben vorgenommen) ergab :

C	52,14%	51,82%
H	3,58%	3,70%
N	11,5 %	11,3 %

¹⁾ Es wurde Grübler'sches Pepsin genommen und eine Lösung von 1 : 7000 hergestellt.

		Asche berechnet.	im Mittel.
C	52,88%	52,57%	52,72
H	3,63%	3,76%	3 69
N	11,66%	11,46%	11,56
O	—	—	32,03

Vergleichen wir diese Zahlen mit jenen, die die Analyse des ersten Präparates ergab, so sehen wir, dass das Verhältniss vom Kohlenstoff zum Stickstoff annähernd dasselbe geblieben ist, nämlich 5 : 1, während der Wasserstoff eine Abnahme, der Sauerstoff eine Zunahme erfahren hat.

Wenn durch die Pepsinverdauung ein Eiweisskörper entfernt worden wäre, so hätte eine Erhöhung des Kohlenstoffgehaltes neben einer Verminderung des Stickstoffgehaltes Platz greifen müssen. Der vorliegende Befund spricht daher nicht zu Gunsten der Annahme eines Eiweissstromas.

Gegen diese Deutung kann eingewandt werden, dass der Eiweisskörper des angenommenen Stromas für Pepsinsalzsäure möglicher Weise nicht angreifbar ist.

Da concentrirte Salzsäure bei anhaltendem Kochen coagulirte Eiweisskörper unter Bildung von löslichen Spaltungsprodukten löst, so wurde noch folgender Versuch gemacht:

Es wurden 3 g Pigment 5 Stunden lang mit concentrirter Salzsäure gekocht, wobei nur ein ganz geringer Theil in Lösung ging, denn die Salzsäure färbte sich nur wenig hellbraun. Dann wurde abfiltrirt und das Filtrat durch Eindampfen unter wiederholtem Wasserzusatz von Salzsäure möglichst befreit. Der Rest wurde mit Wasser aufgenommen und zeigte schwache Millon'sche Reaction. Beim Verdunsten im Exsiccator schieden sich tyrosinähnliche Nadelbüschel aus, doch war die Menge der Krystalle zu klein, um sie genauer untersuchen zu können. — Das auf dem Filter zurückgebliebene Pigment wurde durch oftmaliges Waschen mit Wasser von Salzsäure befreit, dann mit Alkohol und Aether behandelt und getrocknet.

Die Elementaranalyse dieses 5 Stunden lang mit concentrirter Salzsäure gekochten Pigmentes ergab:

			Mittel :
C	58,91	58,74	58,82 %
H	3,40	3,33	3,37 %
N	11,06	11,13	11,10 %
O	—	—	26,61 %

Wie ersichtlich, ist durch Einwirkung der concentrirten Salzsäure der Kohlenstoffgehalt des Pigmentes erhöht, der Stickstoff- und Wasserstoffgehalt erniedrigt worden. Dieser Befund könnte zu der Annahme führen, dass in der That Eiweiss, das kohlenstoffärmer und stickstoffreicher ist als der analysirte Körper, zur Abspaltung gelangt ist, zumal das Auftreten eines die Millon'sche Reaction gebenden Körpers unter den allerdings nur in kleinster Menge erhältlichen Zersetzungsprodukten einer solchen Auffassung Vorschub leistet. Ich möchte jedoch dieser Vermuthung so lange kein Gewicht beilegen, als nicht andere Spaltungsprodukte des Eiweisses sicher nachgewiesen sind, oder der Nachweis des Eiweisses auf anderem Wege sicher geführt ist. Hervorzuheben ist, dass das durch Kochen mit Salzsäure erhaltene Präparat bei der Kalischmelze eben so gut Indol und flüchtige Fettsäuren gab wie das ursprüngliche Pigment.

Dass bei Einwirkung von Alkali eine Veränderung des Pigmentes in gleichem Sinne wie durch Säure erfolgt, soll noch weiter unten erörtert werden.

III. Das chemische Verhalten des Pigmentes.

a) Oxydationsversuche.

Hirschfeld zeigte, dass in einer alkalischen Lösung des Pigmentes auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd das Pigment in braunen Flocken ausfällt, ohne dass eine Oxydation des Farbstoffes dabei stattgefunden hätte, wenigstens war trotz Erhitzens und längeren Stehenlassens eine Entfärbung der Flocken nicht zu beobachten.

Eigene Versuche ergaben, dass das Pigment auch nach Zusatz von Säure durch Wasserstoffsuperoxyd nicht angegriffen wird. Hingegen wirkt Permanganat auf das Pigment deutlich ein, wie aus der Bildung eines braunen Niederschlags und dem Auftreten von Buttersäuregeruch nach Ansäuern zu entnehmen ist.

Wie Gmelin nachgewiesen hat, löst sich das Pigment in rauchender Salpetersäure unter Aufbrausen zu einer roth-

braunen Flüssigkeit, aus welcher durch Kalilauge und Wasser braune Flocken gefällt werden. Aus eigenen Versuchen ergab sich Folgendes:

Während das Pigment beim Kochen in verdünnter Salpetersäure kaum gelöst wird, löst es sich leicht in kochender concentrirter Salpetersäure unter starker Gasentwicklung zu einer klaren, dunkelbraunrothen Lösung.

Mit einem Gemenge von Schwefelsäure und Salpetersäure kurze Zeit erhitzt geht das Pigment gleichfalls unter Aufschäumen in eine klare braunrothe Lösung über. Auf Zusatz von Wasser entsteht dann eine ziemlich dichte Trübung, die sich bei längerem Stehen in braunrothen Flocken absetzt.

Dieser Niederschlag lässt sich nicht mit Aether aufnehmen. Kocht man jedoch das Pigment mit einem Gemenge von Schwefelsäure und Salpetersäure längere Zeit und ruft dann durch Verdünnen mit Wasser den Niederschlag hervor, so lässt sich dieser in Aether überführen. Der Aether nimmt gelbe Farbe an und gibt den gelösten Körper beim Schütteln mit Natronlauge an diese wieder ab. Die Lauge färbt sich dabei braunroth.

Ein Versuch, das Nitroprodukt, das hier offenbar vorlag, in etwas grösserer Menge darzustellen, verlief wie folgt:

3 g Pigment wurden mit conc. Schwefelsäure (ca. 30 ccm.) in einer Schale innig verrieben und in einen Kolben gebracht. Dann wurde langsam Salpetersäure (ca. 5 ccm.) zugesetzt und geschüttelt. Die Masse schäumte stark auf. Nach dreiviertel Stunden war alles Pigment gelöst, und nun wurde die Lösung in 2 Liter destillirten Wassers gegossen. Es bildete sich ein voluminöser dichter Niederschlag, der sich langsam zu Boden setzte. Nach Abgiessen der klaren Flüssigkeit wurde filtrirt, der Niederschlag auf dem Filter gewaschen, bis alle Säure entfernt war, und in wenig Wasser, das durch Ammoniak schwach alkalisch gemacht worden war, gelöst. Die Lösung wurde bei gelinder Temperatur bis zur Trockne eingedampft. Es blieb eine schwarzbraune, glänzende Substanz übrig, die sich in kleinen Platten leicht von der Wandung des Gefässes ablösen liess. Diese Substanz war unlöslich in Säuren, Alkohol, Amylalkohol, Aether, Chloroform, dagegen leicht löslich in Wasser und Alkalien.

Beim Reduciren des Nitroproduktes mit Zinkstaub in alkalischer Lösung trat Entfärbung ein, und ein anilinähnlicher Geruch wurde wahrnehmbar.

In einer Lösung von Kaliumbichromat und verdünnter

Schwefelsäure löst sich das Pigment sehr schnell. Zusatz von Wasser ruft keinen Niederschlag hervor.

b) Einwirkung von Brom.

Nach Angabe von Hirschfeld kann das Pigment durch Chlor entfärbt werden und fällt aus einer alkalischen Lösung nach Uebersättigen mit Salzsäure in weissen Flocken aus, die beim Erhitzen sich wieder braun färben.

Nach meinen Versuchen scheint Bromwasser den Farbstoff bei gewöhnlichen Temperaturen nicht anzugreifen. Ich erhitze daher eine kleine Menge Pigment mit Bromwasser in einer wohlverschlossenen Flasche im Wasserbade mehrere Stunden lang. Nach dem Oeffnen der Flasche fiel es auf, dass die Flüssigkeit kaum mehr nach Brom roch, obwohl das Pigment unverändert aussah. Ich filtrirte, wusch mit Wasser nach und löste dann den Filtrerrückstand in Ammoniak. Aus dieser Lösung fielen nach Ansäuern mit Salzsäure dunkelbraune Flocken aus. Der ausgewaschene Niederschlag erwies sich als bromfrei.

Die Bildung von Bromanil oder anderen Bromprodukten wurde nicht beobachtet.

c) Reductionsversuche.

Hirschfeld reducirte den Farbstoff mit Natriumamalgam und constatirte bei längerem Erhitzen eine Entfärbung der Lösung. Nach Zusatz von Salzsäure fielen leicht gefärbte Flocken aus, die bei langsamem Stehen an der Luft wieder dunkler wurden.

Eigene Versuche zeigten, dass mit Zinnchlorür weder in alkalischer noch in saurer Lösung Entfärbung eintritt, wohl aber eine leichte Entfärbung zu beobachten ist, wenn man das Pigment in alkalischer Lösung mit Zinkstaub längere Zeit kocht. Auch hier scheint nach langem Stehen die Lösung wieder etwas dunkler zu werden.

d) Einwirkung von Mineralsäuren.

Dass, nach Angabe von Hirschfeld, beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aus dem Pigment kein reducirender Körper abgespalten wird, bestätigten auch unsere Versuche. Desgleichen konnten wir die Angabe Gmelin's bestätigen, dass concentrirte Schwefelsäure beim Erwärmen das Pigment wenigstens zu einem Theil löst, und dass beim Verdünnen mit Wasser braune Flocken ausfallen. Dieser ziemlich dichte Niederschlag verschwindet wieder auf Zusatz von Natronlauge. Das saure Filtrat gibt keine Eiweissreactionen.

Auch concentrirte Salzsäure löst, wie schon oben angegeben, das Pigment nur zu einem ganz geringen Theil.

e) Einwirkung von Alkalien.

Mit Natronlauge und Kalilauge längere Zeit gekocht, löst sich das Pigment bis auf einen kleinen Rest. Aus der Lösung wird das Pigment wieder ausgefällt durch Zusatz von Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, während Essigsäure keinen Niederschlag hervorruft. Auch durch Hinzufügen von concentrirter Ammoniumsulfatlösung entstehen in der alkalischen Lösung Flocken. Das Filtrat zeigt keine Eiweissreactionen. Durch Zusatz von Alkohol wird das Pigment gleichfalls wieder gefällt.

Hirschfeld unterwarf sein Pigment der Einwirkung von schmelzendem Kali bei 250°, wobei neben etwas Indol reichlich Ammoniak entwich. In dem Schmelzrückstand konnten flüchtige höhere Fettsäuren, Oxalsäure und ein Farbstoff nachgewiesen werden, welcher anscheinend noch die Eigenschaften des ursprünglichen Pigmentes aufwies, aber bei der Probe nach Lassaigue keinen Stickstoffgehalt erkennen liess und bei der Analyse einen Gehalt von 65,82% C und 4,13% H ergab.

Das Auftreten eines stickstofffreien Produktes wäre für die weitere Aufklärung der Natur des untersuchten Melanins von grösster Bedeutung. Ich habe daher Hirschfeld's Versuch wiederholt, aber das Resultat war ein anderes.

1 g Pigment wurde mit circa der fünffachen Menge Aetzkali unter Zusatz von Wasser in einem Nickeltigel, der in einem Oelbade stand, langsam auf 250° erhitzt und so lange auf dieser Temperatur erhalten, bis die Masse nicht mehr aufschäumte. Sodann wurde erkalten gelassen und die erstarrte Schmelze mit Wasser aufgenommen. Die klare, dunkelbraune Lösung wurde filtrirt, der Farbstoff durch Zusatz von Salzsäure gefällt, auf dem Filter gesammelt und mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether ausgewaschen.

Die Analyse ergab:

C	60,05 %
H	3,65 %
N	10,70 %.

Es war also noch eine bedeutende Menge Stickstoff vorhanden.

Schon beim Schmelzen des Pigmentes war ein deutlicher Indolgeruch aufgefallen, und die in Wasser gelöste Schmelze

zeigte nach Ansäuern mit Salzsäure deutlich Rötung eines Fichtenholzspahns.

Warum ich trotz Einhaltung der von Hirschfeld angegebenen Bedingungen nicht den stickstofffreien Körper erhielt, ist vorläufig unverständlich. Ich bin nicht mehr in der Lage gewesen, den Versuch zu wiederholen und vermag daher nicht zu entscheiden, ob die Schuld an den Versuchsbedingungen lag, oder ob die Existenz des stickstofffreien Melanins überhaupt anzuzweifeln ist. Da sich Hirschfeld zum Stickstoffnachweis der bei schwer zersetzbaren Substanzen recht tückischen Lassaigne'schen Probe bediente, ist letztere Möglichkeit nicht ganz auszuschliessen, wenngleich der wesentlich höhere Kohlenstoffgehalt seines Produktes eine intensive Veränderung der Muttersubstanz ausser Zweifel stellt.

Von grossem Interesse scheint uns dabei der Nachweis, dass die Kalischmelze aus dem Augenpigment denselben oder einen ihm äusserst nahestehenden Körper bildet, wie die Behandlung mit 10%iger Salzsäure. Es geht dies aus der nahen Uebereinstimmung der analytischen Zahlen von Sieber mit den eben angeführten hervor.

Sieber's Melanin (Mittel)		Produkt der	
nach	Einwirkung von 10 % HCl.	Kalischmelze.	conc. HCl.
C	60,12%	60,05%	58,82%
H	4,81%	3,65%	3,37%
N	10,81%	10,70%	11,10%
O	24,26%	25,60%	26,61%

Durch Säure wie durch Alkali scheint somit dasselbe Endprodukt zu entstehen. Auch das in meinem Versuch nach Einwirkung von concentrirter Salzsäure erhaltene Melanin, dessen Analyse ich deshalb beifüge, steht diesem Produkte nahe. Nach dem Angeführten vollzieht sich die Umwandlung bei der Kalischmelze unter Abgabe von Indol, Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren, bei der Säurebehandlung unter Abspaltung eines die Millon'sche Reaction gebenden, jedenfalls der aromatischen Reihe angehörigen Körpers. Da, wie mehrfach erwähnt, andere Versuche, in dem Pigment Eiweiss nachzuweisen, negativ verliefen, so kann dies Verhalten allein nicht die Annahme der Präexistenz echter Eiweissstoffe im Pigmentkorn begründen, zumal die Indolbildung auch bei dem mit kochender Salzsäure erhaltenen Präparat eintritt.

f) Trockene Destillation.

Nach Angabe von Gmelin liefert das Pigment bei der trockenen Destillation brenzliche Produkte und kohlenaures Ammoniak.

Ich habe 3 g Farbstoff in einem kleinen Kolben der trockenen Destillation unterworfen. Das Destillat bestand aus einer braunen harzigen Flüssigkeit von brenzlichem, tabakartigem Geruch und alkalischer Reaction. Es war in Wasser nur wenig, in Aether und Alkohol dagegen leicht löslich. Wurde das Destillat sauer gemacht, so verschwand der nicotinartige Geruch, und es blieb nur der Indolgeruch zurück.

Die wässrige saure Lösung fiel mit Jodquecksilberkalium, Jodwismuthkalium, Phosphorwolframsäure, Quecksilberchlorid und Platinchlorid. Sie gab die Fichtenspahnreaction und auf Zusatz von Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthielt, Rotfärbung. Beim Kochen mit Salzsäure färbte sich die Lösung rothgelb.

Nach diesem Verhalten ist der Schluss gestattet, dass bei der trocknen Destillation neben Indol flüchtige, stickstoffhaltige Basen, wohl der Pyridinreihe angehörig, entstanden waren. Um diese von dem Indol zu trennen, wurde die mit Salzsäure schwach angesäuerte Lösung der Destillation unterworfen, bis kein Indol mehr überging, dann der Rückstand, welcher die basischen zur Verharzung neigenden Produkte enthielt, eingengt. Doch konnte eine Krystallisation der salzsauren Salze nicht erreicht werden.

In einem weiteren Versuch wurde das Pigment mit Zinkstaub der trocknen Destillation unterworfen. Das spärliche Destillat zeigte das gleiche Verhalten wie bei einfacher trockner Destillation.

Die Schwierigkeit, sich genügendes Ausgangsmaterial zu verschaffen, machte vorderhand weiteren Untersuchungen ein Ende. Aus dem Angeführten lassen sich aber einige der Hervorhebung würdige Punkte entnehmen:

1. Ein Stroma war in den Pigmentkörnchen auf keine Weise nachweisbar.

2. Die Zusammensetzung der Pigmentkörnchen bei Anwendung ganz indifferenter Isolirungsmethoden ergab sich zu $C = 54,56\%$, $H = 5,34\%$, $N = 12,7\%$, $O = 27,40\%$. Das Verhältniss $C:N$ ist darin nahezu $5:1$, ebenso wie in dem

seinerzeit von Scherer ebenfalls mit indifferenten Methoden, aber viel aschereicher erhaltenen Farbstoff.

3. Bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien verändert sich die Zusammensetzung, indem der Kohlenstoffgehalt steigt, der Stickstoffgehalt herabgeht. So erklärt sich die mehr oder weniger abweichende Zusammensetzung der von Rosow mit Essigsäure, von mir mit Pepsinsalzsäure, von Sieber und von mir mit Salzsäure erhaltenen Produkte.

4. Als Endprodukt der Einwirkung von kochender Säure und schmelzendem Kali wird ein Körper erhalten (Sieber und ich), in welchem das Verhältniss von C : N sich 13 : 2 stellt.

5. Es erfolgt eine Abspaltung von Indol, Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren bei der Kalischmelze (Hirschfeld und ich), die Abspaltung eines aromatischen, die Millon'sche Reaction gebenden Complexes bei der Säureeinwirkung (ich).

6. Eine nähere chemische Beziehung des Augenpigmentes zu dem Blutfarbstoff oder dem Hämatin ist nirgends zu erkennen. Wohl aber ist die Bildung desselben aus dem indol-liefernden aromatischen Complex des Eiweissmoleküls nach Zusammensetzung und sonstigem Verhalten als durchaus möglich zu bezeichnen.

Anmerkung bei der Correctur. Das, wie oben erwähnt, bei den natürlich vorkommenden und künstlich aus Eiweiss erzeugten Melaninen, so wie bei den Halogenderivaten des «Proteinochromogens» anzu-treffende Verhältniss der Kohlenstoff- und Stickstoffatome gleich 5 : 1 weist auf die Präexistenz einer entsprechend zusammengesetzten aromatischen Gruppe im Eiweissmolekül hin. Die von Herrn Prof. Hofmeister in dieser Richtung veranlassten Untersuchungen haben insofern Erfolg gehabt, als es Herrn Dr. Fritz Baum im hiesigen Laboratorium gelungen ist, unter den Produkten der Pankreasverdauung einen krystallisirenden, gut charakterisirten Körper von der Zusammensetzung $C_{10}H_{16}N_2O_4$ aufzufinden, welcher bei der Kalischmelze Indol bezw. Skatol liefert.

Zur Frage der Zuckerbildung aus Eiweiss.

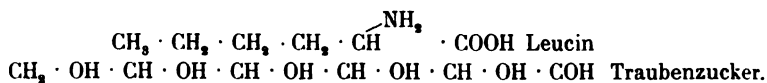
Von
Prof. Dr. Rudolf Cohn.

(Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und med. Chemie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 7. Juli 1899.)

Das Postulat der Physiologie, der Nachweis des Modus der Zuckerbildung aus Eiweiss im Thierkörper, ist bisher nicht erfüllt worden. Zwar ist es in letzter Zeit mehrfach gelungen, aus Eiweiss resp. bestimmten Eiweissverbindungen Zucker abzuspalten, aber selbst wenn dieser Zucker aus dem eigentlichen Eiweissmolekül stammt, so sind doch die Mengen, die man erhalten hat, so gering, dass sie die sehr grossen Quantitäten Zucker, die im Stoffwechsel aus Eiweiss entstehen müssen und die nach manchen Berechnungen 60% und mehr betragen können, absolut nicht erklären. Sieht man sich nun die einzelnen Stücke, aus denen das Eiweissmolekül, wie die zahlreichen Spaltungsversuche ergeben haben, zusammengesetzt ist, daraufhin an, welches am geeignetsten sein könnte, als Quelle für den Zucker zu dienen, so kommt hiefür am meisten in Betracht das Leucin, und die Vermuthung, dass dieses zu der Zuckerbildung in Beziehung stehen möchte, ist vor Kurzem auch schon von anderer Seite ausgesprochen worden (Müller und Seemann); eine experimentelle Prüfung der Frage ist aber, so weit mir bekannt, bisher nicht in Angriff genommen worden. Nicht nur ist das Leucin das Hauptspaltungsprodukt des Eiweisses — wie meine Versuche ergeben haben, kann man wohl 50%

und vielleicht noch mehr aus Casein gewinnen —, sondern ein Vergleich der Constitution desselben mit derjenigen des Traubenzuckers ergibt sofort nahe Beziehungen beider zu einander.



Der Thierkörper bedürfte, um Leucin in Traubenzucker überzuführen, gar nicht einmal complicirter Synthesen, sondern es handelte sich nur um Oxydationen, Abspaltung der Amidogruppe und Reduction, d. h. dreier Processe, die derselbe nach den vorliegenden Thatsachen sehr wohl auszuführen vermag.

Nun dürfte allerdings der Nachweis der direkten Umwandlung des Leucins in Zucker bei der leichten Verbrennlichkeit des letzteren im Organismus mit grossen Schwierigkeiten verbunden sein, ich glaubte daher von vornherein einen anderen, mehr indirekten Weg wählen zu sollen, der meiner Meinung nach leichter zum Ziele führen könnte. Wenn es nämlich gelänge, nachzuweisen, dass Leucin in Glycogen umgewandelt wird, so dürfte, da dieses doch in Zucker übergeht, der Schluss gerechtfertigt sein, dass das Leucin die Quelle des Zuckers ist und dass es dann also auch bei der Entstehung von Zucker aus Eiweiss eine Rolle, vielleicht die Hauptrolle spielt. Zu den Versuchen, die ich zur Prüfung der Frage vorgenommen habe und über die ich in Folgendem berichten will, diente mir ein Theil der grossen Leucinmengen, die ich in den letzten Jahren bei meinen Eiweisspaltungsversuchen gesammelt habe.

Versuch I.

2 kräftige, ziemlich gleich grosse Kaninchen hungern 4 1/2 Tage. Sie bekommen nur Wasser ad libitum. Das eine Thier erhält Abends 7 Uhr 20 g noch nicht ganz reines Leucin, das aber jedenfalls frei von andern Amidosäuren war, in circa 200 ccm. Wasser gelöst, dem zur Abstumpfung der Säure Na₂CO₃ bis zur schwach alkalischen Reaction zugesetzt war, mittelst Schlundsonde auf ein Mal in den Magen gegossen.

Am nächsten Vormittag 11 1/4 resp. 11 1/2 Uhr wurden die Lebern der beiden Thiere nach der Külz'schen Methode

auf Glycogen verarbeitet. Die Leber des Leucinkaninchens wog 45 g, die des Kontrollthieres 65 g. Erstere enthielt 2,0702 g Glycogen (dasselbe war N-frei und enthielt nur 0,0018 g Asche) = 4,6%, während die Leber des Kontrollthieres nur 0,7529 = 1,16% Glycogen lieferte, d. i. zu Gunsten des Leucinkaninchens 3,44%.

Bei der Section erwiesen sich Magen und der ganze Darm des Leucinkaninchens schwappend mit Flüssigkeit gefüllt. Der Darm war beim schnellen Eröffnen der Bauchhöhle, da ich auf die pralle Füllung nicht vorbereitet war, angeschnitten worden und der Inhalt grösstentheils in die Bauchhöhle ausgelaufen. Aus dem filtrirten Mageninhalt war nach dem Eindampfen etwas Leucin zu erhalten. Ein Theil des stark mit Blut vermengten Darminhaltes wurde enteiweisst und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der bräunliche Rückstand bestand zum grössten Theil aus Leucin. Wieviel Leucin von den verabreichten 20 g resorbirt worden war, liess sich in diesem Versuch nicht bestimmen, augenscheinlich war aber ein sehr grosser Antheil der Resorption entgangen.

Versuch II.

15 g chemisch reines Leucin (dasselbe schmolz bei 278°, krystallisirte in sechseckigen Tafelchen) wurden mit 200 ccm. Wasser gekocht, lösten sich aber selbst nach längerem Kochen nur theilweise auf. Erst auf Zusatz etwas reichlicherer Mengen Na_2CO_3 trat beim Kochen Lösung ein, aus der indess schon beim Abkühlen auf Körpertemperatur sich das Leucin wieder auszuscheiden begann. Danach erwies sich also auch das Na-Salz als in Wasser schwerlöslich.

Die noch körperwarne Lösung wurde einem mittelgrossen Kaninchen, das 8 Tage gehungert hatte, mit der Schlundsonde eingegossen. Vor beendeter Eingiessung starb das Kaninchen jedoch plötzlich. Eine Todesursache konnte durch die Section nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich war das Thier durch das lange Hungern so geschwächt, dass es die starke Anfüllung des Magens nicht vertrug.

Versuch III.

Ich beabsichtigte zunächst wieder, chemisch reines Leucin anzuwenden, es war aber nicht möglich, dasselbe in genügender Menge in nicht zu viel Wasser in Lösung zu bringen. 15 g wurden mit 220 ccm. Wasser gekocht, allmählich noch 40 ccm. kalt gesättigter Na_2CO_3 -Lösung zugefügt; trotz längeren Kochens ging nicht alles in Lösung und beim Abkühlen schied sich ein erheblicher Theil wieder aus.

Ich gab nun einem kräftigen Kaninchen nach 4-tägigem Hungern ca. 30 g Leucin. Es wurden zu dem Zwecke 50 g noch etwas unreines Leucin, das nach dem Ausfall der Millon'schen Reaction nur geringe Mengen Tyrosin enthalten konnte, mit 200 ccm. Wasser gekocht und, ohne dass sich alles gelöst hatte, zum Abkühlen 6 Stunden stehen gelassen, darauf die hellbraune Lösung abgegossen. Dieselbe, 220 ccm., wird mit 20 ccm. kalt gesättigter Na_2CO_3 -Lösung bis zu neutraler Reaction versetzt und davon ca. 180 ccm. dem Kaninchen eingegossen. Etwa 10 ccm. werden fractionirt eingedampft, um sich von der Reinheit des verabreichten Leucins zu vergewissern. Es war nur reines Leucin daraus zu isoliren. Der Rest der Lösung wurde mit dem nach dem Abkühlen ausgeschiedenen Antheil vereinigt und zur Trockne verdampft. Es blieben 20 g, das Kaninchen hat also, wie angegeben, ca. 30 g Leucin erhalten.

Die Leber des am nächsten Vormittag 10 $\frac{1}{2}$ Uhr getödteten Kaninchens wog 57 g und ergab 1,2505 Glycogen = 2,3%, während die Leber eines gleichzeitig auch 4 Tage hungernden Kaninchens 62 g wog und 1,1156 g Glycogen = 1,8% enthielt. Die nur geringe Differenz in dem Glycogengehalt beider Thiere, allerdings auch zu Gunsten des Leucinkaninchens, ist aber vielleicht dadurch bedingt gewesen, dass durch ein Versehen der mit Aetzkali versetzte Leberbrei des Leucinkaninchens zu weit eingedampft wurde, er bildete eine dicke Masse, ein grosser Theil war am Rande der Schaal fest eingetrocknet, sodass ich diese Glycogenbestimmung nicht als zuverlässig ansehen kann.

Versuch IV.

Ein kräftiges Kaninchen, das 7 Tage gehungert hatte, erhält Abends Leucin. Ich nahm diesmal 24 g chemisch reines Leucin, das ich in fein geriebenem Zustande mit 250 ccm. Wasser so lange verrührte, bis alles benetzt war, dann fügte ich einige Cubikcentimeter Olivenöl und etwas Na_2CO_3 zu und schüttelte das Gemenge in einer Flasche. Es bildete sich eine haltbare Emulsion. Von ihr wurden dem Kaninchen in 2 Portionen um 6 Uhr 150 ccm. und um 7 Uhr 50 ccm. eingegossen. Aus dem übrig gebliebenen Rest wurden nach Entfernung des Oels durch Aether 8 g Leucin durch Eindampfen zurückgewonnen. Das Kaninchen bekam also 16 g Leucin. Am nächsten Vormittag 10 $\frac{1}{2}$ Uhr wurde es getötet und die Leber, welche 52 g wog, auf Glycogen verarbeitet. Sie lieferte 1,0846 g = 2,1 $\frac{1}{2}$ %.

Ich machte nun den Versuch, das im Magendarmkanal zurückgebliebene Leucin möglichst quantitativ zu bestimmen, um so einen Anhalt zu gewinnen für die wirklich resorbierte Menge. Im Magen war noch sehr viel Flüssigkeit enthalten, gemengt mit geringen Futterresten. Der ganze Darm, besonders der Dickdarm, war wiederum prall mit Flüssigkeit gefüllt. Der Mageninhalt wurde nach dem Aufschneiden besonders gesammelt, der Inhalt des Dünndarmes durch Streichen mit den Fingern entfernt, der des Dickdarmes durch Aufschneiden und Abspülen mit wenig Wasser wiederum besonders gewonnen. Der Mageninhalt wurde reichlich mit Wasser verdünnt, gekocht, ca. die Hälfte abfiltrirt. Nach dem Eindampfen hinterblieben 4 g fast reines Leucin. Die nicht durchfiltrirte Hälfte wurde nochmals mit Wasser verdünnt, gekocht, das Filtrat, das nur bis etwa zur Hälfte gewonnen werden konnte, da das Filtriren stockte, hinterliess nach dem Eindampfen 1 g Leucin. Der Magen enthielt also ungefähr 6 g Leucin. Der Dünndarminhalt wurde enteiwisst, das Filtrat ergab 0,5 g Leucin. Der Dickdarminhalt, ca. 300 ccm., wurde noch mit Wasser verdünnt, mit viel Kieselguhr geschüttelt und ca. die Hälfte abfiltrirt. Das dunkelbraun gefärbte Filtrat hinterliess beim Einengen

einen braunen Rückstand, in dem sich reichlich Leucinkrusten absetzten. Eine quantitative Isolirung des Leucins daraus erschien aussichtslos. Der Rückstand wurde zur Trockne verdampft, zweimal mit absolutem Alkohol ausgekocht, die vereinigten Filtrate auf etwa 20 ccm. eingengt; es scheidet sich 0,5 g fast reines Leucin aus. Der von dem kochenden Alkohol nicht aufgenommene Rückstand wog trocken 5,5 g. Sie wurden in Wasser gelöst, die Lösung wurde durch Thierkohle nur sehr wenig entfärbt, das Filtrat erstarrte beim Einengen zu einem sehr dicken Krystallbrei. Eine Probe davon, auf einer Thonplatte abgesogen, hinterliess einen fast farblosen Rückstand, der fast vollständig sublimirte. Das Sublimat schmolz bei 275°. Nach ungefährender Schätzung dürfte wohl mindestens die Hälfte von den 5,5 g aus Leucin bestanden haben. Danach enthielt also der Dickdarm ungefähr $(0,5 + 2,75) 2 = 6,5$ g Leucin. Rechnet man alles zusammen, so können jedenfalls nur wenige Gramm Leucin resorbirt sein.

Versuch V.

Von 2 mittelgrossen Kaninchen, die 6 Tage gehungert hatten, erhält das eine eine in folgender Weise hergestellte Leucinlösung innerlich: 48 g noch etwas unreines Leucin werden mit 180 ccm. Wasser gekocht und 30 ccm. kalt gesättigter Lösung von Na_2CO_3 zugefügt. Nachdem noch einige Zeit im Sieden erhalten war, wird nach dem Abkühlen von dem Ungelösten abfiltrirt. Der ungelöste Rückstand wiegt nach dem Trocknen bei 100° 22 g. Die Lösung enthält also 26 g Leucin. Es sind 200 ccm. einer hellbraunen, durchsichtigen, schwach alkalischen Lösung von nicht laugenhaftem Geschmack, die dem Kaninchen in 3 Portionen Abends um 5 $\frac{1}{4}$, 6 und 6 $\frac{1}{2}$ Uhr mittelst Schlundsonde eingegeben wurden. Dieses Vorgehen wurde gewählt in der Annahme, dass die Resorption besser von Statten gehen würde, wenn der Magen nicht so stark von der grossen Quantität Flüssigkeit angefüllt werden würde, wie in den früheren Versuchen.

Am nächsten Morgen sind beide Kaninchen sehr schwach. Sie werden um 10 Uhr getödtet und die Lebern schnell auf

Glycogen verarbeitet. Die Leber des Leucinkaninchens wog 82 g; sie lieferte 2,3213 g Glycogen = 2,8%. Dasselbe war N-frei.

Die Leber des Kontrollthieres, die 70 g wog, enthielt nur minimale Spuren Glycogen.

Die Versuche haben also eine unzweifelhafte Glycogenbildung nach der Leucindarreichung ergeben, wie aus folgender Zusammenstellung ersichtlich ist.

Versuch	Hungertage	Glycogengehalt der Leber		Glycogengehalt der Leber in %	
		Leucinthier	Kontrollthier	Leucinthier	Kontrollthier
I	4 1/2	2,0702 g	0,7529 g	4,6	1,16
III	4	1,2505 „ ?	1,1156 „	2,3 ?	1,8
IV	7	1,0846 „	—	2,1	—
V	6	2,3213 „	Spuren	2,8	—

Rechne ich dazu das in den Muskeln jedenfalls noch enthaltene Glycogen, das ich nicht bestimmt habe, so sind die Gesamtglycogenmengen so gross, dass sie kaum anders, als durch eine direkte Umwandlung des Leucins in Glycogen erklärt werden können. Dass sie nicht noch grösser sind, liegt an der merkwürdig schlechten Resorbirbarkeit des Leucins im Kaninchendarm. Wir können aus diesem Grunde und auch weil wir wegen der Schwerlöslichkeit des Leucins nicht grössere Mengen verabreichen können, nicht so grosse Mengen Glycogen zu finden erwarten, als wenn wir den Organismus mit grossen Mengen des leicht resorbirbaren Traubenzuckers überschwemmen. Ob sich in Bezug auf die Resorption des Leucins andere Thierklassen günstiger verhalten und ob es dann bei diesen gelingt, unzweideutigere Resultate zu erhalten, soll noch untersucht werden.

Ich bin mir sehr wohl bewusst, dass meine Versuche die in Rede stehende Frage, ob das Leucin die Zwischenstufe bei der Entstehung des Zuckers aus Eiweiss im Thierkörper ist, noch nicht endgültig entschieden haben, wenngleich die höchste Wahrscheinlichkeit dafür spricht; die Versuche müssten dazu noch auf breiterer Grundlage ausgeführt werden. Vor Allem müsste auch das Verhältniss der andern, bei der Spaltung des

Eiweisses resp. Leims entstehenden Amidosäuren zur Glycogenbildung untersucht werden. Asparaginsäure und Glycocoll, welche auch Glycogenbildner sind, kommen schon wegen der quantitativen Verhältnisse bei der Zuckerbildung im Thierkörper weniger in Betracht, während die in sehr grossen Mengen bei der Eiweisspaltung auftretende Glutaminsäure bisher, soviel ich weiss, noch nicht daraufhin geprüft worden ist, was ich demnächst zu thun gedenke.

Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins.

I. Theil.

Von

Dr. Ernst P. Flek.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 23.)

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft,
Kunst und Litteratur in Böhmen.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Juli 1899.)

Wie ich vor etwa zwei Jahren mitgetheilt habe, lassen sich aus Witte-Pepton durch Fällung mit Ammonsulfat vier verschiedene Albumosenfractionen isoliren.¹⁾ Aus dem mit Salz nicht mehr fällbaren Antheil gelang dann durch Fällung als Perjodid und Trennung mittelst Alkohols noch die Darstellung von zwei «Peptonen». Diese sechs Fractionen, die sich durch ihr reactionelles Verhalten als verschiedene Bruchstücke des Fibrinmoleküls erwiesen, konnten in weiteren Arbeiten von Umber²⁾ und Alexander³⁾ auch bei der Pepsinverdauung

1) Das von Hofmeister herrührende Verfahren der fractionirten Salzfällung (vergl. Kauder, Archiv für experim. Patholog. u. Pharmak., Bd. 20, S. 415, 1886) ist auf Albumosengemenge zuerst von J. Pohl in Hofmeister's Laboratorium angewandt und gelegentlich kurz beschrieben worden (J. Pohl, Bemerkungen über künstlich dargestellte Eiweissnucleine (Hemialbumosennucleine). Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XIII, S. 294, 1889). Pohl unterschied drei Fractionen, von denen die erste (A) nach meinen Erfahrungen die Gesamtmenge der Proto- und Heteroalbumose und meine Deuteroalbumose A enthalten haben dürfte, während seine B- und C-Fraction meiner Deuteroalbumose B und C entsprechen.

2) F. Umber, Die Spaltung des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, sowie des Seroglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 258.

3) F. Alexander, Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 411.

anderer Eiweisskörper, insbesondere auch solcher, welche durch die Möglichkeit ihrer Krystallisation ein einwandfreies Ausgangsmaterial boten, in gleicher Weise nachgewiesen werden. Neuerdings konnte Zunz¹⁾ durch Fractionirung mit Zinksulfat aus den peptischen Verdauungsprodukten verschiedener Eiweisskörper ebenfalls die gleichen Fractionen gewinnen. Auch bei der Einwirkung verdünnter Säuren auf Serum- und Eialbumin (Goldschmidt)²⁾ und bei der Oxydation von Hühnereiweiss mit Kaliumpermanganat (Bernert)³⁾ konnte das Auftreten der gleichen Albumosenfractionen sichergestellt werden. Auf Grund dieser Thatsachen schien es für den weiteren Einblick in den Bau der Eiweisskörper zunächst wünschenswerth, neben der genaueren chemischen Charakteristik dieser Fractionen ihren näheren genetischen Zusammenhang festzustellen. Bei der Bearbeitung dieser Aufgabe, bei der ich mich der werthvollen Rathschläge Prof. Hofmeister's zu erfreuen hatte, erwies es sich wegen der stets anwachsenden Zahl der zu berücksichtigenden Körper als zweckmässig, eine Fraction nach der anderen vorzunehmen. Dabei kamen vor Allem naturgemäss die nach den bisherigen Erfahrungen dem intacten Molekül am nächsten stehenden Produkte — die «primären Albumosen⁴⁾» — zunächst an die Reihe.

Die Arbeiten der Kühne'schen Schule,⁵⁾ vor allem die

1) E. Zunz, Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte mittelst Zinksulfat. Zeitschrift für physiolog. Chemie. Bd. XXVII, S. 219.

2) F. Goldschmidt, Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe. Inaugural-Dissertation, Strassburg i. Els., 1898.

3) R. Bernert, Ueber Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat. Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XXVI, S. 272.

4) Wie Zunz (vergl. diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132) und ich (s. unten) auf verschiedenem Wege gefunden haben, sind die «primären Albumosen» jedenfalls nicht die einzigen primären Produkte der peptischen Eiweisspaltung. Ich will daher die Bezeichnung «primär» dort, wo sie conventionell das Gemenge von Proto- und Heteroalbumose bedeuten soll, stets durch Anführungszeichen kenntlich machen.

5) Siehe die Litteraturangabe in der früheren Publication. Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XXIV, S. 246.

Untersuchungen von Neumeister, stellen die «primären» Albumosen (neben dem bei der peptischen Verdauung kaum in Betracht kommenden Antialbumid) als Muttersubstanzen aller weiteren peptischen Verdauungsprodukte hin. Entsprechend dieser allgemein getheilten Vorstellung war daher zu erwarten, dass die peptische Spaltung gerade dieser sogenannten «primären» Albumosen werthvolle Aufschlüsse in der gewünschten Richtung bieten würde, zumal die Vermuthung nahe lag, dass die Proto- und Heteroalbumose, trotz sonstiger Aehnlichkeit, nicht bloss in ihrem physikalischen Verhalten, wie es bei der Dialyse hervortritt, sondern auch in ihrer chemischen Constitution Unterschiede aufweisen dürften, welche sich folgerichtig auch in den Beziehungen zu den übrigen Fractionen ausprägen müssten.

Ich habe mich daher in der vorliegenden Mittheilung ausschliesslich auf die «primären» Albumosen beschränkt, wobei in erster Linie die systematische Ausarbeitung einer geeigneten Trennungsmethode in Betracht kam, in zweiter Linie die möglichst gute Charakterisirung der isolirten Körper.

I. Trennung der Hetero- und Protoalbumose.

Kühne und Chittenden¹⁾ gründen die Trennung der beiden «primären» Albumosen auf die Eigenschaft der Heteroalbumose in salzfreiem Wasser unlöslich zu sein, so dass dieselbe aus einem mittelst Salz niedergeschlagenen Gemenge der beiden Körper durch Dialyse ausfällt. Sie verfahren in der Weise, dass das aus einer neutralisirten Verdauungslösung nach Sättigung mit Kochsalz abgeschiedene Albumosengemenge nach wiederholtem Füllen und Lösen der Dialyse unterworfen wird. Dabei scheidet sich die Heteroalbumose zum Theil in Klumpen, zum Theil gummiartig ab. Die weitere Reinigung kann nach Kühne's und Chittenden's Angaben entweder direkt durch Lösen in salzhaltigem Wasser, oder erst nach abermaligem Ausfällen mit Steinsalz durch Dialyse erfolgen; das letztere

¹⁾ Kühne und Chittenden, Ueber Albumosen. Zeitschrift für Biologie. N. F. Bd. 2, S. 16 u. ff., S. 32 u. ff., 1884.

Vorgehen ist jedoch wegen grosser Verluste nicht zu empfehlen. Die bei der Dialyse in Lösung gebliebene Protoalbumose wird nach Abfiltriren der Heteroalbumose neuerdings ausgesalzen und der Dialyse unterworfen.

Diese Methode, die bisher allein die Möglichkeit bot, die beiden Albumosen zu trennen, erwies sich in der Folge nicht als ganz zuverlässig; denn bereits die Fällung mit Kochsalz in neutraler Lösung ist, wie früher gezeigt wurde,¹⁾ im Stande, neben den beiden «primären» andere Albumosen mitzureissen, andererseits aber vermag sie nicht eine völlige Abscheidung der Protoalbumose herbeizuführen, so dass nach dieser Richtung hin keine Isolirung möglich ist. Aber auch die Trennung der beiden Produkte von einander lässt zu wünschen übrig. Bereits Neumeister²⁾ musste bei seinen Verdauungsversuchen die Erfahrung machen, dass die Löslichkeit der Heteroalbumose in kaltem, salzfreiem Wasser grösser ist, als man vorher angenommen hatte, und dass «concentrirtere Lösungen von Protoalbumose auch bei vollständiger Abwesenheit von Salz noch deutliche Mengen von Heteroalbumose aufzunehmen vermögen, wenn man dieselben stark erwärmt». «Die Flüssigkeit scheidet die einmal gelöste Heteroalbumose nicht wieder ab». Der Unmöglichkeit einer vollständigen Trennung schreibt er den Umstand zu, dass in der Protoalbumose stets Spuren der «Antigruppe» nachzuweisen sind. Machte sich also schon in Folge der Gefahr der Verunreinigung der Protoalbumose durch die Heteroalbumose der Wunsch nach einer besseren Trennungsmethode geltend, so drängte sich auch noch das Bedenken auf, die Heteroalbumose möchte vermöge ihrer Eigenschaft, sich in Form von festen Klumpen und schmierigen Belägen bei der Dialyse abzuscheiden, Theile der löslichen Protoalbumose eingeschlossen zurückhalten. Endlich zeigte es sich, dass, wenn man statt Kochsalz Ammonsulfatlösungen zur Abscheidung der «primären» Albumosen benützte, wegen der viel geringeren

1) E. P. Pick, a. a. O., S. 272.

2) Neumeister, Bemerkungen zur Chemie der Albumosen und Peptone. Zeitschrift für Biologie, N. F. Bd. 5, S. 292, 1887.

Diffusionsgeschwindigkeit dieses Salzes die entsprechend längere Dauer der Dialyse empfindliche Verluste an Heteroalbumose durch Uebergang in unlösliche Dysalbumose veranlasste; dazu gesellte sich noch der Umstand, dass für die Weiterbearbeitung geringerer Quantitäten auch die Art der Abscheidung der Heteroalbumose an den Flächen des Pergamentschlauches in Form eines zarten, allenthalben ausgebreiteten Belages wegen Verlusten beim Sammeln desselben wenig zweckdienlich war.

Von neueren Arbeiten verdienen jene Schrötter's¹⁾ besondere Aufmerksamkeit; derselbe hat in mehreren Untersuchungen die nähere Charakterisirung von Albumosen mittelst der Erzeugung von Chlorhydräten, Acetyl- und Benzoylderivaten versucht, ohne aber im Uebrigen von dieser so durchgeführten Trennung, trotz der durch die Anwendung dieser Methoden unleugbar erzielten Fortschritte, befriedigt worden zu sein. Hier soll lediglich auf ein von ihm aus dem Witte-Pepton isolirtes Produkt hingewiesen werden, das nach der Ansicht des Autors der Kühne'schen Protoalbumose am nächsten stehen soll, und dessen Löslichkeit in Alkohol besonders hervorgehoben zu werden verdient. Schrötter erwärmte das mit starkem Methylalkohol extrahirte Witte-Pepton mit Zink und Schwefelsäure und erhielt bei weiterer Verarbeitung eine gelbliche, hygroskopische Masse, aus deren in der Wärme hergestellten methylalkoholischen Auszügen eine Albumose erhalten wurde,

1) H. Schrötter, Beiträge z. Kenntniss der Albumosen. Sitzungsber. d. mathem.-naturw. Classe der Kaiserl. Akad. der Wissensch. Jahrg. 1893, C II, Abth. II b, S. 633.

Derselbe, Beiträge z. Kenntniss d. Albumosen, II. Mittheilung. Sitzungsber. d. math.-naturw. Classe d. Kaiserl. Akad. d. Wissensch. Jahrg. 1895, C IV B, Abtheilung II b, S. 448.

Derselbe, Beiträge z. Kenntniss d. Albumosen, III. Mittheilung. Sitzungsber. d. mathem.-naturw. Classe d. Kaiserl. Akad. d. Wissensch. Jahrg. 1896, C V B, Abtheil. II b, S. 138.

Derselbe, Beiträge z. Kenntniss d. Albumosen, IV. Mittheilung. Sitzungsber. d. mathem.-naturw. Classe der Kaiserl. Akad. d. Wissensch. Jahrg. 1898, C VII, Abth. II b, Mai, S. 245.

Derselbe, Ueber Albumosen des Pepton Witte. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. XXVI, S. 338.

welche behufs weiterer Reinigung nach dem Vorgang von Paal in Chlorhydrate übergeführt und aus diesen isolirt wurde. Später aus Witte-Pepton direkt dargestellte Chlorhydrate lieferten zwei Albumosen, von denen eine, die ebenfalls methylalkohollöslich und schwefelarm ist, in ihren analytischen Zahlen der zuerst beschriebenen nahe steht.

Auch Paal¹⁾ hatte aus käuflichem Albuminpepton nach wiederholter Extraction mit absolutem Methylalkohol in der Wärme und Kälte ein in kaltem absoluten Methylalkohol lösliches Produkt erhalten, das «in naher Beziehung zur alkohol-löslichen Albumose Schrötter's stehen dürfte». Die wässrige Lösung dieser Substanz liess sich bereits durch Kochsalz reichlich fällen, auf Zusatz von Essigsäure erfolgte Vermehrung des Niederschlags, und durch Ammonsulfat trat eine beinahe völlige Abscheidung ein, Reactionen, welche direkt auf die Anwesenheit von «primären» Albumosen im Sinne Neumeister's hinweisen, aber die Einheitlichkeit des Produkts keineswegs sicherstellen.

Während die nachfolgend mitgetheilten Untersuchungen bereits im Gange waren, erschien eine Abhandlung Folin's,²⁾ in welcher dieser mit Metallsalzen eine Zerlegung der Kühne'schen Protoalbumose herbeizuführen suchte. Auch er ging von Witte-Pepton aus. Die Trennung von der Heteroalbumose glaubte er nach Kühne's Vorgang durch Dialyse zu erzielen. Ein aus der dialysirten Lösung mit concentrirtem Kupferacetat ausgefälltes Produkt liess sich durch Bleiacetat in zwei Körper trennen, von denen der eine, durch Bleiacetat und Salpetersäure nicht fällbare, vom Verfasser als reine Protoalbumose angesprochen wird; da dieser jedoch nur in kleinen Mengen zu erhalten war, konnte der Autor über ihn keine näheren Angaben machen.

Da von den angeführten Methoden vorläufig nur die

¹⁾ C. Paal, Ueber die Peptonsalze des Eieralbumins. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 27, S. 1845.

²⁾ Otto Folin, Ueber die Spaltungsprodukte der Eiweisskörper, I. Mittheilung. Ueber einige Bestandtheile von Witte's Pepton. Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. XXV, S. 152.

Methode der Dialyse für eine Trennung der Proto- und Heteroalbumose in Betracht kam, und auch diese die angedeuteten Mängel aufwies, war es meine erste Aufgabe, ein Verfahren ausfindig zu machen, das dem ins Auge gefassten Zweck besser entspräche.

Eigene Isolierungsversuche.

a) Versuche zur Trennung der Proto- und Heteroalbumose durch Fractionirung mit Ammonsulfat.

Die Ueberlegung, dass die sich bei den übrigen Albumosen so deutlich ausprägenden Unterschiede gegenüber der Ammonsulfatfällung auch bei den «primären» Albumosen auftreten würden, wenn man geeignete Concentrationen der Albumosenlösung verwendete, lenkte zu dem Versuche hin, das Witte-Pepton, dessen Verhalten bereits früher in 5%iger Lösung festgestellt worden war, der fractionirten Salzfallung in niedrigeren Concentrationen zu unterwerfen, in der Erwartung, dass die in stärkeren Concentrationen einander nahe gerückten Fällungsgrenzen in verdünnterer Lösung eine bessere Scheidung zulassen würden. Dementsprechend wurden, in derselben Weise wie früher, in neutralen Lösungen von 0,2%, 0,5%, 1%, 1,5% und 2% die Fällungsgrenzen des Witte-Peptons für die «primären» Albumosen bestimmt; es ergaben sich jedoch, abgesehen von geringfügigen Schwankungen, die gleichen Werthe, wie früher für 5%ige Lösung. Anhaltspunkte für eine gesonderte Ausfällung der einen oder der anderen Albumose ergaben sich nicht.

Darauf wurde der Versuch gemacht, die bereits nach Kühne und Chittenden durch Salzfallung und Dialyse isolirten Produkte der Fractionirung zu unterwerfen in der Hoffnung, dass die so bereits einigermaßen getrennten Produkte in ihren Fällungsgrenzen einen Unterschied darbieten könnten. Doch auch diese Erwartung ging nicht in Erfüllung. Die Fällung der Protoalbumose begann bei einem Ammonsulfatgehalt von 2,4 ccm in 10 ccm der Gesamtlösung und war bei 4,2 ccm. in 10 ccm zu Ende, entsprach also wieder den schon bekannten Fällungsgrenzen für die «primären» Albumosen.

Die bei der Dialyse ausfallende Heteroalbumose versuchte ich ferner in der Weise von eventuell noch anhaftender Protoalbumose zu reinigen, dass ich sie in Wasser suspendirt längere Zeit auf dem Wasserbade erlitzte (um eine Art Coagulation, wie sie Kühne annimmt, zu bewirken und sie so von der gelösten Protoalbumose zu trennen), und dann die Fällung mit Ammonsulfat vornahm. Dabei ging jedoch ein erheblicher Theil der Substanz in Lösung, sei es, dass die Verunreinigung mit Protoalbumose bedeutend war, oder, was wahrscheinlicher, dass die Coagulation unvollständig blieb. Der zurückgebliebene Rest erwies sich als in Wasser unlöslich, löste sich aber leicht in schwach ammoniakalischem Wasser. Die mit dieser Lösung angestellte Versuchsreihe ergab als untere Fällungsgrenze einen Ammonsulfatgehalt von 1,6 cem : 10 cem, während die obere mit der für die Protoalbumose gefundenen zusammenfiel. Der frühzeitige Beginn der Fällung erscheint etwas auffallend, doch hängt er möglicher Weise mit der in diesem Falle nicht bekannten Concentration der Lösung zusammen; es mag jedoch bemerkt werden, dass bei einem anderen Versuche Dysalbumose fractionirt zu fällen, dieselbe untere Fällungsgrenze festgestellt werden konnte; was die obere Ausfällungsgrenze anlangt, auf die es bei dem Versuche hauptsächlich ankam, so bot auch sie keinen Anhaltspunkt zur Trennung der beiden Produkte.

β) *Versuche zur Trennung der Proto- und Heteroalbumose mit Alkohol.*

Bereits in dem letztangeführten Versuche wurde die Coagulation in wässriger Lösung versuchsweise zur Reinigung der Heteroalbumose verwandt; der mit verschiedenen Abänderungen wiederholte Versuch ergab jedoch immer dasselbe unbefriedigende Resultat. Von der in Wasser aufgequollenen Masse löste sich ein grosser Theil (Protoalbumose mit bedeutenden Mengen von Heteroalbumose), der coagulirte Theil dagegen ging immer, wie auch Kühne und Chittenden angeben, zum grossen Theil, oft der Hauptmasse nach in Dysalbumose über. Nun wurde untersucht, ob bei anhaltendem Kochen mit Alkohol die Ausfällung der Heteroalbumose soweit quantitativ erfolgt, dass sie für die Trennung von der Protoalbumose benützt werden könnte. Im Folgenden

sind die darauf bezüglichen Versuche angeführt, wobei der Kürze halber aus der grösseren Zahl nur jene herausgegriffen sind, welche für den Gang der Untersuchungen in der Folge entscheidend waren.

Eine ca. 10%ige, an 500 ccm. betragende Lösung wiederholt mit Ammonsulfat gereinigter «primärer» Albumosen wurde bei neutraler Reaction mit dem doppelten Volumen 95%igen Alkohols in einem etwas mehr als 2 Liter fassenden Kolben unter Rückfluss auf dem Wasserbade 13 Stunden lang gekocht. Es entstand ein reichlicher, flockiger Niederschlag; die überstehende schön gelb gefärbte, klare Lösung trübte sich beim Abkühlen ein wenig und liess nach längerem Stehen einen Niederschlag ausfallen; es wurde daher nach völliger Klärung der Lösung von dem abgeschiedenen Niederschlag abfiltrirt, der Niederschlag gut abgepresst, das alkoholische Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Niederschlag und Rückstand des Alkoholfiltrats wurden in ihrem Verhalten verglichen. Dabei stellten sich mehrfache Unterschiede heraus. Der Rückstand löste sich selbst in kaltem Wasser, während die Lösung des Niederschlags erst in der Wärme erfolgte. Die mit beiden Lösungen in der gewöhnlichen Weise mit Ammonsulfat angestellten Versuchsreihen ergaben zwar identische Fällungsgrenzen — die Fällung begann bei 2,2—2,4 ccm. : 10 ccm. Gesamtlösung und war bei 3,4—3,6 ccm. : 10 vollendet —, aber die Fällbarkeit durch Alkohol war eine deutlich verschiedene. Der Nachweis, dass diese Verschiedenheit nicht auf die relative Löslichkeit eines und desselben Körpers in 60%igem Alkohol zu beziehen war, wurde folgendermassen erbracht. Die wässerigen Lösungen von Niederschlag und Rückstand wurden in der gleichen Weise, wie sonst mit Ammonsulfat, mit 95%igem Alkohol auf ihre Fällungsgrenzen untersucht, so dass die gleiche Substanzmenge (2 ccm.) bei gleichbleibendem Volumen der Gesamtlösung (10 ccm.) mit Alkohol in steigender Concentration zusammengebracht wurde. Die Versuchsanordnung war auch sonst mit der beim Ammonsulfat üblichen identisch.

(Siehe Tabelle Ia u. Ib.)

Aus diesen Tabellen geht hervor, dass bei der getroffenen Versuchsanordnung der in den Alkoholniederschlag übergehenden Körper bereits bei einem ganz geringen Alkoholzusatz zu fallen beginnt und diese Fällung, soviel man aus der Stärke des Niederschlags entnehmen kann, bei einem Gehalt von ungefähr 37% Alkohol vollständig ist; der in alkoholische Lösung übergegangene Körper zeigt wohl auch bei einem geringen Alkoholzusatz schwache, manchmal stärkere Opalescenz, die aber

Tabelle Ia.

1. Niederschlag in kochendem Wasser gelöst; Reaction neutral.

Lösung	Wasser	95 % Alkohol	Fällung
2 ccm.	7,7 ccm.	0,3 ccm.	Opalescenz
2 „	7,5 „	0,5 „	feinflockiger Niederschlag
2 „	7,3 „	0,7 „	Opalescenz
2 „	7 „	1 „	„
2 „	6 „	2 „	„
2 „	5 „	3 „	starke Opalescenz
2 „	4 „	4 „	allmählich zunehmender feinflockiger Niederschlag; nach einigem Stehen massenhafte Ausscheidung von Flocken.
2 „	3 „	5 „	
2 „	2 „	6 „	
2 „	1 „	7 „	
2 „	—	8 „	

Tabelle Ib.

2. Lösung des Trockenrückstandes; Reaction schwach sauer.

Lösung	Wasser	95 % Alkohol	Fällung
2 ccm.	7,5 ccm.	0,5 ccm.	nach einigem Stehen schwach opal
2 „	7,3 „	0,7 „	Opalescenz
2 „	7,1 „	0,9 „	„
2 „	7,0 „	1 „	„
2 „	6 „	2 „	„
2 „	5 „	3 „	schwache Opalescenz
2 „	4 „	4 „	klar
2 „	3 „	5 „	„
2 „	2 „	6 „	„
2 „	1 „	7 „	Spur Opalescenz
2 „	—	8; 8,5; 9 ccm.	gleichmässige starke Fällung

eigenthümlicher Weise bei einem bestimmten Alkoholgehalt vollkommen verschwindet, andererseits in den klaren, alkoholischen Lösungen schon durch geringen Wasserzusatz zu erzeugen ist. Diese vorübergehend auftretende Opalescenz, welche bei der

Beurtheilung der Versuchsreihen zunächst grosse Schwierigkeiten bot, liess sich später auf einfache Weise deuten. Sie entsprach keineswegs einer Beimengung des in Alkohol unlöslichen Körpers, was ja schon aus der Klärung der Proben bei einem stärkeren Alkoholzusatz hervorgeht, sondern steht in innigem Zusammenhange mit den Löslichkeitsverhältnissen des alkohollöslichen Körpers. Was nun die Ausfällung dieses Körpers anbelangt, so zeigt die Tabelle, dass erst ein sehr hoher Alkoholgehalt zu seiner Fällung hinreicht, dass er vor Allem noch in Lösung bleibt, wenn bereits der im Niederschlage befindliche Körper völlig ausgefällt ist. Prägnanter noch gestalteten sich die Fällungsverhältnisse in folgenden Versuchen:

Tabelle II.

1. Lösung des Niederschlags; verdünnte, neutrale Lösung.

Lösung	95 % Alkohol	Fällung	Filtrat auf Zusatz von 0,2 ccm. 95%igen Alkohols
2 ccm.	0,1 ccm.	Opalescenz	} starke Opalescenz; nach kurzem Stehen Fällung
2 „	0,2 „	} starke	
2 „	0,4 „	} Opalescenz	} schwächere Fällung als vorher schwache Opalescenz
2 „	0,6 „	Fällung	
2 „	0,8 „	„	} klar; nach längerem Stehen Spur Opalescenz
2 „	1,0 „	„	
2 „	2,0 „	} massenhafter, flockiger Niederschlag	klar
2 „	3,0 „		„
2 „	4,0 „		„
2 „	5,0 „		„
2 „	6,0 „		„
2 „	7,0 „		„
2 „	8,0 „		„

Es geht aus dieser Tabelle hervor, dass die Fällung bei einem geringfügigen Alkoholzusatz beginnt und sehr rasch ihr Maximum erreicht; schon bei Zusatz eines halben Volumens 95%igen Alkohols ist die Ausfällung eine vollständige. Dem gegenüber stellt sich die Fällung des gelösten Trockenrückstandes folgendermassen:

Tabelle III.

2. Lösung des Trockenrückstandes. (Reaction schwach sauer.)

Lösung	95% Alkohol	Fällung der				
		un- verdünnten.	2 fach verdünnten.	4fach verdünnten.	8fach verdünnten.	20fach verdünnten Lösung
2 ccm.	0,2 ccm.	sehr schwache Opalescenz	Opalescenz	Opalescenz	Opalescenz	schwache Opalescenz
2 »	0,4 »	stärkere Opalescenz	starke Opalescenz	»	stärkere Opalescenz	Opalescenz
2 »	0,6 »	»	schwache Opalescenz	»	schwache Opalescenz	stärkere Opalescenz
2 »	0,8 »	»	»	»	»	schwache Opalescenz
2 »	1,0 »	schwache Opalescenz	»	sehr schwache Opalescenz	»	sehr schwache Opalescenz
2 »	2,0 »	klar	klar	klar	klar	klar
2 »	3,0 »	»	»	»	»	»
2 »	4,0 »	»	klar; nach mehrstünd. Stehen Opal.	sehr schwache Opalescenz	»	Opalescenz
2 »	5,0 »	schwache Opalescenz	sehr schw. Opal. nach läng. Stehen Fällung	Opalescenz	Opalescenz	stärkere Opalescenz
2 »	6,0 »	Trübung	starke Opalescenz, später Fällung	starke Opalescenz	starke Opalescenz	starke Opalescenz
2 »	7,0 »	Fällung	Fällung	Fällung	Fällung	
2 »	8,0 »	—	»	»	»	

Auch hier zeigen sich wieder die vorübergehend auftretenden Opalescenzen, die der Lösung des Körpers in stark wässrigem Alkohol eigenthümlich sind; die eigentliche Ausfällung beginnt erst bei einem Alkoholzusatz von 5 ccm. 95%igen Alkohols auf 2 ccm. der Lösung; gleichzeitig ist zu ersehen, dass die Concentration der Albumosenlösung keinen wesentlichen Einfluss auf das so fest gestellte Fällungsverhältniss ausübt.

Der Einfluss der Reaction auf die Alkoholfällung wurde in eigenen Versuchsreihen geprüft.

Je 30 ccm. der genau neutralisirten Lösung des Niederschlags und des Trockenrückstandes wurden mit je 2 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Kalilauge, bezw. $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure versetzt und in der gleichen Weise wie in den letzt angeführten Tabellen mit steigenden Mengen Alkohol zusammen gebracht. Dabei ergab sich, dass die Aenderung der Reaction gegenüber den früher gefundenen Verhältnissen von geringem oder gar keinem Einfluss ist; nur die Intensität der Fällungen des in Alkohol unlöslichen Körpers schien bei alkalischer Reaction geringer zu sein,

was auf die Anwesenheit der relativ grossen Mengen freien Alkalis gegenüber der in den einzelnen Proben vorhandenen geringen Substanzmenge zu beziehen ist und der grösseren Löslichkeit der, wie sich später zeigen wird, mit der Heteroalbumose identischen Substanz in alkalihaltigem Alkohol entspricht. Um sicher einen Ueberschuss von freiem Alkali zu vermeiden, wurde noch folgender Versuch angestellt:

Eine Partie des in gewöhnlicher Weise isolirten Gemenges der beiden Albumosen wird nach 13stündigem Kochen mit 60%igem Alkohol in der früher angegebenen Art verarbeitet, sowohl in die Lösung des Niederschlags, als auch des Trockenrückstandes fein gepulverte kohlensaure Magnesia eingetragen, die Lösung aufgekocht und filtrirt; die stark alkalisch reagirenden Flüssigkeiten verhielten sich gegen allmählich steigenden Alkoholzusatz folgendermassen:

Tabelle IV.

1. Lösung des Niederschlages			2. Lösung des Trockenrückstandes.		
Lösung	95% Alkohol	Fällung	Lösung	95% Alkohol	Fällung
2 ccm.	0,1 ccm.	klar	2 ccm.	0,2 ccm.	klar
2 "	0,2 "	Opalescenz	2 "	0,4 "	schwache Opalescenz
2 "	0,4 "	flockiger Niederschlag	2 "	0,6 "	" "
2 "	0,6 "	stärkerer Niederschlag	2 "	0,8 "	Spur Opalescenz
2 "	0,8 "	massenhafter, überall gleich- mässiger flockiger Nieder- schlag.	2 "	1,0 "	klar
2 "	1,0 "		2 "	2,0 "	"
2 "	2,0 "		2 "	3,0 "	"
2 "	3,0 "		2 "	4,0 "	schwache Opalescenz
2 "	4,8 "		2 "	5,8 "	starke milchige Trübung

Ueberblickt man die gesammten Versuchsergebnisse, so gelangt man zu dem Schlusse, dass sich durch mehrstündiges Kochen (die Anfangs 12—13stündige Dauer des Kochens wurde im Laufe der Versuche ohne Nachtheil auf 3—4 Stunden herabgesetzt) mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols aus einer Lösung «primärer» Albumosen mindestens 2 Körper bequemer

trennen lassen, von denen der eine ohne Rücksicht auf die Reaction und Concentration der Flüssigkeit sich durch einen Alkoholgehalt von etwa 30% fällen lässt, während der andere in mehr als 65%igem Alkohol gelöst bleibt. Dabei verhalten sich die beiden Körper gegen gesättigte Ammonsulfatlösung gleich, indem sich jeder für sich bei einem Salzgehalt von 3,4—3,6 ccm. : 10 ccm. ausfällen lässt, wobei bemerkenswerth ist, dass ein Gemenge beider auf die angegebene Weise getrennten Körper wieder die ursprünglichen Fällungsgrenzen der «primären» Albumosen zeigt.

Gleiche Mengen der beiden Albumosen wurden vereinigt und bei neutraler Reaction in gewohnter Weise mit Ammonsulfat fractionirt. Die Fällung des so hergestellten Albumosengemenges begann bei 2,6 ccm. Ammonsulfatzusatzes : 10 ccm. der Gesamtlösung und war erst bei 4,2 ccm. : 10 beendigt. Es wäre möglich, dass dieser Unterschied in den Fällungsgrenzen des Gemenges und der isolirten Albumosen seinen Grund in einer gegenseitigen salzartigen Bindung der beiden Produkte hätte, wofür auch mancherlei andere Beobachtungen, so die Löslichkeit geringer Mengen Heteroalbumose in concentrirten Protoalbumoselösungen¹⁾ und weiter die bedeutenden von Cohnheim²⁾ gefundenen Unterschiede im Säurebindungsvermögen der beiden «primären» Albumosen zu sprechen scheinen.

Es blieb noch übrig, die beiden Körper mit Kühne's «primären» Albumosen zu identificiren, was auf Grund des physikalischen Verhaltens leicht gelang. Der Niederschlag, der nach dem Abpressen und Eintrocknen jenes leimartige Aussehen zeigte, wie es Kühne für die Heteroalbumose als charakteristisch beschreibt, war in kaltem Wasser nur schlecht, besser in warmem Wasser löslich, die heissbereitete Lösung trübte sich rasch nach dem Abkühlen und liess einen reichlichen Niederschlag ausfallen; zuweilen geschah es, dass selbst in warmem Wasser die Lösung nur unvollständig gelang infolge der Umwandlung eines Theiles der Substanz in Dysalbumose. Ausschlaggebend aber war die Dialyse, wobei bereits nach kurzer Zeit der Körper beinahe vollständig in klumpigen

1) Neumeister, Zur Kenntniss der Albumosen a. a. O. S. 392.

2) O. Cohnheim, Ueber das Salzsäurebindungsvermögen der Albumosen und Peptone. Zeitschr. f. Biologie. Bd. 15, S. 489, 1896.

Massen ausfiel; es konnte sonach keinem Zweifel unterliegen, dass die durch Alkohol so leicht fällbare Substanz mit der von Kühne und Chittenden dargestellten Heteroalbumose identisch war. Der nach dem Eindampfen der alkoholischen Lösung erhaltene Trockenrückstand löste sich ziemlich glatt in kaltem Wasser, wenn auch die erhaltenen Lösungen nicht klar waren. Beim Dialysiren war selbst nach Tagen keine Abscheidung bemerkbar. Es konnte daher der in Alkohol lösliche Körper nur als Protoalbumose angesprochen werden.

Es war nun geboten zu untersuchen, ob das die Darstellung etwas complicirende Kochen mit Alkohol, das sich, wie erwähnt, ohne Nachtheil von 13 auf 3—4 Stunden hatte einschränken lassen, überhaupt nöthig war. Ich war anfänglich von der Vorstellung ausgegangen, die beim Kochen mit Wasser eintretende sogenannte Coagulation der Heteroalbumose beim Kochen mit Alkohol ausgiebiger gestalten zu können. In der Folge zeigte es sich aber, dass das mit Alkohol in der Hitze gefällte Produkt sich genau ebenso verhielt, wie die entsprechende durch Salzfällung gewonnene Albumose, also von einer coagulirenden Wirkung des Alkohols nicht gesprochen werden konnte. Es war daher zu erwarten, dass auch die Alkoholfällung in der Kälte eine Trennung des Albumosengemenges ermöglichen würde. Die darauf bezüglichen Versuche mögen in Folgendem kurz angeführt werden:

Aus Witte-Pepton mit gleichem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung isolirte «primäre» Albumosen wurden durch achtmaliges Lösen und Füllen mit Ammonsulfat gereinigt, die 5%ige neutrale, wässrige Lösung des beinahe salzfreien Produkts versetzte ich in den einzelnen Proben mit steigendem Alkoholzusatz. Es ergab sich das gleiche Resultat, wie in dem analogen Versuch nach Kochen mit 95%igem Alkohol. Die völlige Ausfällung des als Heteroalbumose angesprochenen Körpers gelang schon bei einem geringen Alkoholzusatz: 1 ccm. 95%igen Alkohols auf 2 ccm. Lösung. Behufs Untersuchung des in die alkoholische Lösung gegangenen Körpers wurden 100 ccm. der oben verwendeten Lösung mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gefällt und, um die Heteroalbumose möglichst vollständig abzuschneiden, durch mehrere Tage stehen gelassen, hierauf filtrirt; mit dem alkoholischen Filtrate wurde folgende Versuchsreihe ausgeführt.

Tabelle V.

Alkoholische Lösung	95 % Alkohol	Fällung	Filtrat nach 24ständigem Stehen der Fällung mit 0,4 ccm. 95 %igen Alkohols versetzt.
4 ccm. $\left\{ \begin{array}{l} \text{et ccm. ursprüngl.} \\ \text{wässrige Lösung} \\ \text{1 ccm. Alkohol} \end{array} \right.$	0,1 ccm. (+ 2 ccm.)	klar	
4 „ „	0,2 „ „	„	Alle Proben zeigen
4 „ „	0,4 „ „	„	Trübungen und Nieder-
4 „ „	0,6 „ „	„ } Nach 24 Stunden	schläge, welche der
4 „ „	0,8 „ „	„ } schwache Opaleszenz	Reihe nach schwächer
4 „ „	1,0 „ „	schwach opalescent	werden; eine obere
4 „ „	1,2 „ „	stark „	Grenze lässt sich selbst
4 „ „	1,4 „ „	Trübung	bei Zusatz von 7 ccm.
4 „ „	1,6 „ „	„	(5 + 2) Alkohol auf
4 „ „	1,8 „ „	„	2 ccm. der Lösung nicht
4 „ „	2,0 „ „	„	erreichen.
4 „ „	2,4 „ „	stärkere Trübung	
4 „ „	2,8 „ „	„	
4 „ „	3,0 „ „	„	
4 „ „	3,2 „ „	„	
4 „ „	3,4 „ „	„	
4 „ „	3,6 „ „	„	
4 „ „	3,8 „ „	„	
4 „ „	4,0 „ „	„	
4 „ „	4,2 „ „	„	
4 „ „	4,4 „ „	„	
4 „ „	4,6 „ „	„	
4 „ „	4,8 „ „	„	
4 „ „	5,0 „ „	„	

Man ersieht aus der Tabelle, dass Heteroalbumose nicht in das Filtrat übergegangen war; denn die erste Trübung trat bei einem Alkoholzusatz (2 : 2,6) ein, bei dem die Heteroalbumose schon restlos ausgefällt ist. Zugleich sieht man, wie schwer der in den Alkohol gegangene Körper zu fällen ist, da bei dem relativ hohen Alkoholgehalt von 2 ccm. Lösung : 7 ccm. 95 %igen Alkohols noch immer nicht eine vollständige Ausfällung erreicht werden konnte.

Dass bei dem eingeschlagenen Verfahren das Kochen thatsächlich keine bessere Abscheidung erzielt und keine nennenswerthen Reste von Heteroalbumose ins Filtrat übergehen, die Trennung daher wirklich eine vollkommene ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass eine durch Alkoholfällung hergestellte Protoalbumosenlösung bei nachträglichem anhalten-

den Kochen nur eine minimale, etwa als Heteroalbumose zu deutende Abscheidung erkennen liess, wie sie auch bei der Alkoholbehandlung in der Wärme regelmässig bei der ersten Reinigung aufzutreten pflegt.

Auch der die Heteroalbumose enthaltende Alkoholniederschlag zeigte in beiden Fällen das gleiche Verhalten. Es besteht danach kein Zweifel, dass die Trennung der beiden «primären» Albumosen, wie sie durch Kochen mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols zu erreichen ist, auch durch einfache Alkoholfällung in der Kälte erzielt wird. Damit ist gleichzeitig eine Handhabe gegeben, mit Sicherheit in Gemengen beider Albumosen die Hetero- resp. Protoalbumose zu erkennen und sich zu überzeugen, inwiefern andere Trennungsmethoden ihrem Zweck entsprechen.

γ) Prüfung anderer Trennungsmethoden mit Hilfe des Alkoholverfahrens.

Wie aus dem Mitgetheilten hervorgeht, kann Kühne's Trennungsverfahren (Dialyse) eine annähernd reine Heteroalbumose liefern, wenn es auch erst durch wiederholtes Lösen derselben in Salzlösung und neuerliche Dialyse gelingen dürfte, anhaftende Protoalbumose ganz zu beseitigen. Das Alkoholverfahren bietet in dieser Richtung den Vortheil, dass Protoalbumose in mässig verdünntem Alkohol leichter löslich ist als in Wasser (vgl. S. 241 u. ff.) allein und daher bei Alkoholfällung der Heteroalbumose weniger leicht von dieser mitgerissen werden dürfte. Hingegen lässt sich leicht zeigen, dass die bei der Dialyse gelöst zurückgebliebene Protoalbumose stets noch erhebliche Reste von Heteroalbumose gelöst enthielt. Trotz anhaltenden und wiederholten Dialysirens gibt die von der ausgeschiedenen Heteroalbumose abfiltrirte Protoalbumosenlösung auch bei mässiger Concentration auf Zusatz von nur $\frac{1}{4}$ Volumen 95%igen Alkohols starke Trübung, auf einen nur geringen Mehrzusatz einen starken Niederschlag.

Es gelingt somit ebensowenig die Protoalbumose durch Dialyse völlig von Heteroalbumose zu befreien, wie auf gleichem Wege eine Serumalbuminlösung von Serumglobulin. Hingegen

führt ein anderes von Kühne und seinen Schülern angewandtes Verfahren zur Darstellung von reiner Protoalbumose, wenngleich unter grossen Verlusten. Nach Kühne, Chittenden und Neumeister lässt sich die Heteroalbumose durch Sättigung mit Kochsalz bei neutraler Reaction vollkommen aussalzen, während die Protoalbumose erst durch Säurezusatz ganz abgeschieden werden kann. Da durch die Ausfällung mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat einerseits eine scharfe Trennung gegenüber den sogenannten Deuteroalbumosen möglich ist, andererseits aber sich die Heteroalbumose mit einem Theile der Protoalbumose durch Kochsalz ausfällen lässt, so müsste der bei Kochsalzsättigung zurückbleibende Rest der primären Albumosen eine reine Protoalbumose ergeben. Ein mit Ammonsulfat dargestelltes und durch Ausfällung mit Kochsalz in der angegebenen Weise gereinigtes Präparat, mit Alkohol in steigendem Verhältniss versetzt, ergab folgende Reihe:

Tabelle VI.

Lösung	95 % Alkohol	Fällung
2 ccm.	0,2 ccm.	klar
2 „	0,4 „	Spur Opalescenz
2 „	0,6 „	„
2 „	0,8 „	klar
2 „	1,0 „	„
2 „	2,0 „	klar, nach längerem Stehen Spur Opalescenz
2 „	3,0 „	Opalescenz
2 „	4,0 „	} Flockiger Niederschlag.
2 „	5,0 „	
2 „	6,0—8,0 „	

Diese Zahlen stimmen mit denen einer reinen Protoalbumose überein: nur erscheinen die Fällungsgrenzen unwesentlich tiefer gerückt, vermuthlich in Folge des Salzgehaltes der Lösung. Es erweist sich also die in der angeführten Weise gewonnene Protoalbumose als ein reines Produkt, insofern eine Verunreinigung mit Heteroalbumose nicht vorzuliegen scheint. Allerdings empfiehlt sich die Darstellung auf diesem Wege kaum, da ja

durch die Ausfällung mit Kochsalz die Hauptmasse zugleich mit der Heteroalbumose entfernt wird.

II. Darstellung der getrennten Produkte.

Auf Grund der angeführten Isolirungsversuche wurden die ersten Darstellungen aus Witte-Pepton so vorgenommen, dass eine wässrige Lösung durch wiederholte Ammonsulfatfällung gereinigter «primären» Albumosen mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gefällt und auf dem Wasserbade durch 3—4 Stunden im Kochen erhalten wurde. In den späteren Darstellungen wurde das Erhitzen unterlassen und die Fällung bloss in der Kälte vorgenommen. Der entstandene Niederschlag lieferte die Heteroalbumose, während das alkoholische Filtrat die Protoalbumose enthielt. Der Niederschlag, gut abgepresst, wurde in kochendem Wasser gelöst, wobei jedoch immer ein Theil unlöslich blieb, filtrirt und die sich beim Erkalten rasch trübende Lösung wiederum mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gefällt; darauf setzte sich in kurzer Zeit ein massiger, schön weisser, flockiger Niederschlag ab. Derselbe wurde nach mehrstündigem Stehen abfiltrirt, abgepresst, wiederum heiss gelöst und das ganze Verfahren so oft wiederholt, bis das alkoholische Filtrat des so erhaltenen Niederschlags entweder keine oder nur äusserst schwachen Biuretreaction gab und nach dem Eindampfen keinen nennenswerthen Rückstand hinterliess, so dass Reste von Protoalbumose als Verunreinigung ausgeschlossen werden konnten. Der so, gewöhnlich nach viermaligem Lösen und Fällen mit Alkohol, erhaltene Niederschlag wurde nach nochmaligem Lösen mit grossem Ueberschuss von 95%igem Alkohol gefällt, auf ein Seidenfilter gebracht, zunächst mit 60%igem, dann mit 95%igem Alkohol und endlich mit Aether gewaschen und getrocknet. Das gewonnene Produkt erwies sich als frei von Ammonsulfat.

Die die Protoalbumose enthaltende alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft und die wässrige Lösung des Rückstandes wiederum mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gefällt; die in den ersten Stunden nach der Fällung klare Lösung trübte sich bei längerem Stehen und setzte, insbesondere bei concentrirteren Lösungen, einen geringen, schleimigen Niederschlag ab, welcher zwar zum grössten Theil als ausgefallene Protoalbumose, zum Theil aber auch als Heteroalbumose angesprochen werden musste, da eine Probe des gelösten Bodensatzes, durch allmählichen Alkoholzusatz geprüft, nicht das Verhalten der reinen Protoalbumose ergab, sondern am ehesten einem Gemenge beider Albumosen entsprach. Es wurde demnach die klar filtrirte, alkoholische Lösung wiederum eingedampft und die wässrige Lösung des Rückstandes ebenso wie vorher behandelt und das Gleiche etwa 5—6 Mal wiederholt; man erhielt dann eine klare, alkoholische Lösung, welche im verschlossenen Gefäss auch nach tagelangem Stehen klar blieb und keinen Niederschlag mehr zeigte. Die auf solche Art

gewonnene Protoalbumose war noch salzhaltig, im Uebrigen aber ein reines, besonders auch von Heteroalbumose freies Produkt. Nichtsdestoweniger liess der etwas schleppende und zeitraubende Gang der Darstellung die Ermittlung eines bequemeren Verfahrens wünschenswerth erscheinen.

Nach verschiedenen Versuchen stellte sich die nachfolgende Darstellungsweise als die beste heraus. Alle in der Folge angestellten Untersuchungen beziehen sich auf Produkte, welche nach diesem Verfahren gewonnen sind.

Als Ausgangsmaterial diente Witte-Pepton, das sich für unsere Zwecke recht gut bewährt hatte. Eine möglichst concentrirte (ca. 40%ige) Witte-Peptonlösung wurde in der Weise hergestellt, dass Pepton in kochendes Wasser unter Umrühren portionenweise eingetragen wurde, bis die Lösung nichts mehr aufnahm und beinahe Syrupconsistenz besass. Die noch warme Flüssigkeit wurde mit dem doppelten Volumen 95%igen Alkohols versetzt und in der Kälte mindestens 5—6 Stunden, gewöhnlich über Nacht, stehen gelassen. Es setzte sich dann ein massenhafter, teigiger, am Boden festsitzender Niederschlag ab, von dem die darüber befindliche, schön gelb gefärbte alkoholische Lösung gut abgegossen werden konnte. Der Niederschlag enthielt an 70% des Ausgangsmaterials, so dass ungefähr 30% in den immerhin 75—80% starken Alkohol hineingingen. Die alkoholische Lösung wurde auf Protoalbumose, der Niederschlag auf Heteroalbumose verarbeitet.

1. Darstellung der Heteroalbumose.

Der gut abgepresste Niederschlag wird in 10%iger¹⁾ wässriger Lösung mit verdünnter Schwefelsäure neutralisirt und mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt; die Albumose scheidet sich in Form eines festen Kuchens an der Flüssigkeitsoberfläche ab. Der letztere abgehoben, sorgfältig auf dem Thonteller von der Flüssigkeit befreit, wurde gelöst und aus ca. 10%iger neutraler Lösung,

¹⁾ Eine concentrirtere Lösung zu verwenden, empfiehlt sich nicht, wenn eine Verunreinigung durch mitgerissene Theile anderer Albumosen sicher vermieden werden soll.

wie vorher, ausgesalzen, abgepresst, das Ganze nochmals wiederholt. Die so gewonnene Albumose versetzt man in 10%iger wässriger Lösung mit dem halben Volumen 95%igen Alkohols; dabei scheidet sich die Heteroalbumose, wenn auch nicht vollständig,¹⁾ so doch in solcher Reinheit ab, dass man Verunreinigung durch mitgerissene Substanzen nicht zu befürchten braucht. Der Niederschlag wird mit dem Filter gut abgepresst, in heissem Wasser gelöst, filtrirt und wiederum mit dem halben Volumen 95%igen Alkohols gefällt. Während das Filtrat des gesammelten Niederschlages nur noch Spuren ungefällter Körper enthält, ist ein nach der dritten Fällung mit Alkohol erhaltenes, farbloses Filtrat so gut wie frei von irgend welchen alkohollöslichen Resten. Der Niederschlag, immer wieder gut abgepresst, erweist sich als salzfrei, und wird nun nach nochmaligem Lösen und Fällen auf einem Seidenfilter mit 32%igem, dann mit 95%igem Alkohol und endlich mit Aether gewaschen. Man erhält so den Körper schneeweiss. Beim Trocknen bräunt er sich und bildet leimartige Tafeln, die aber zerrieben immer noch ein weisses Pulver liefern. Die Ausbeute des so dargestellten Körpers ist eine verhältnissmässig gute — sie kann für das Rohprodukt auf 5–8% des Ausgangsmaterials geschätzt werden —, wenn auch die Verluste beim Reinigen diesen Procentsatz noch erheblich herabsetzen.

Zu dem gleichen Ziel, wie nach diesem Verfahren, kann man natürlich auch gelangen, wenn man den Niederschlag nach der ersten Alkoholfällung zuerst mit 32%igem Alkohol wiederholt umfällt und dann erst die Trennung von den übrigen Albumosen durch Halbsättigung mit Ammonsulfat vornimmt; man erhält in diesem Falle bei dem nachfolgenden Aussalzen die Albumose nicht in Klumpen, sondern in schneeweissen Flocken. Das erste Verfahren ist von beiden

1) Geringe Reste der Heteroalbumose gehen ins Filtrat über, das neben dieser noch verhältnissmässig reichliche Mengen von Resten anderer Albumosen enthält, die bei der Aussalzung trotz wiederholter Fällung dem Ammonsulfatniederschlag anhaften bleiben.

das einfachere, indem es mit der gleichzeitigen Isolirung des Präparates die Reinigung desselben von dem anhaftenden Ammonsulfat ermöglicht; dagegen besitzt es den Nachtheil, bei der Reinigung Verluste dadurch zu schaffen, dass ein Theil der Albumose in die unlösliche Dysalbumose übergeht, und die Ausbeute dementsprechend zu verschlechtern.

2. Darstellung der Protoalbumose.

Aus der wie oben gewonnenen alkoholischen Lösung wird der Alkohol im Vacuum abdestillirt, der Rückstand getrocknet, gut pulverisirt, in Wasser gelöst und die etwa 10%ige, stark alkalisch reagirende Lösung nach vorheriger Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure in derselben Weise wie bei der Heteroalbumose wiederholt durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Die Protoalbumose scheidet sich in Form von Flocken ab, die zu gelb gefärbten festen Kuchen zusammenfließen, deren Lösungen starken Bouillongeruch besitzen und weder in saurer noch in neutraler Lösung mit dem doppelten Volumen 95%igen Alkohols zu fällen sind. Dagegen konnte aus diesen Lösungen manchmal durch vorsichtigen Zusatz verdünnter Essigsäure eine Trübung oder die Abscheidung eines Niederschlages erzielt werden.

Dieser Niederschlag war nur theilweise im Ueberschuss von Essigsäure löslich, trocknete auf dem Filter zu einem gelbbraunen Pulver, am Boden des Becherglases zu einem Firniss ein, der, in heissem Wasser gelöst, weder mit Essigsäure noch mit Salpetersäure wieder zu fällen war: Halbsättigung mit Ammonsulfat schied ihn in Flocken aus, ebenso fällte verdünnte Kupfersulfatlösung und Essigsäure-Ferrocyankalium: die Millon'sche, die Xanthoproteinreaction, sowie jene nach Molisch waren positiv, beim Kochen mit Lauge und Bleiacetat schied sich Schwefelblei ab. Die erste Annahme, dass es sich um einen dem Fibrin beigemengten, nucleinartigen Körper handle, konnte, nachdem das Fehlen von Phosphor nachgewiesen worden war, nicht aufrecht erhalten werden. Da dieses Produkt in anderen Lösungen, welche aus verschiedenen Witte-Peptonpräparaten gewonnen waren, trotz des sorgfältigen Einhaltens aller Vorbedingungen nicht gefunden werden konnte, sein Vorkommen im Witte-Pepton also kein constantes zu sein scheint, dehnte ich die Untersuchung auf dieses Produkt nicht weiter aus. Es ist möglich, dass dieser Körper in näherer Beziehung zu den durch Essigsäure

fällbaren Albumosen steht, die Kühne¹⁾ zuerst unter den Produkten der Pankreasverdauung, später bei der Untersuchung von Koch's gereinigtem Tuberculin (Acroalbumose) auffand, und zu denen möglicher Weise auch ein analoger, von Folin²⁾ aus dem Witte-Pepton neuerdings isolirter Körper gehört.

Konnte der eben erwähnte Körper, auf den immer mit tropfenweise zugesetzter Essigsäure gefahndet wurde, in der Lösung gefunden werden, so wurde so lange Essigsäure zugesetzt, bis eine Probe der von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirten Lösung auf vorsichtigen Säurezusatz keine Trübung mehr gab. Die so erhaltene klare Lösung enthielt noch Ammonsulfatreste, zu deren Entfernung die Flüssigkeit mit einer gesättigten Lösung reinen, essigsauren Baryums unter Vermeidung eines Ueberschusses versetzt wurde. Nach mehrstündigem Stehen setzte sich der Niederschlag gut ab, und man erhielt eine leicht und klar filtrirbare Lösung, in welcher durch Zusatz von wässriger Ammoniumcarbonatlösung der in Lösung gebliebene Baryt ausgefällt wurde. Die durchs Filter geschickte Lösung wurde aufgeköcht, von dem sich eventuell nachträglich noch ausscheidenden Baryumcarbonat abfiltrirt und auf dem Wasserbade zur Syrupdicke eingedampft. Diesen Rückstand in kaltem Wasser klar zu lösen, bereitet, zumal für concentrirtere Lösungen, Schwierigkeiten, während die in der Wärme hergestellten Lösungen sich rasch beim Erkalten trüben und je nach der Concentration bei längerem Stehen einen geringeren oder stärkeren schleimigen Bodensatz liefern. Dem gegenüber vermag ein Zusatz von Alkohol zu diesen trüben, wässrigen Lösungen eine augenblickliche Klärung herbeizuführen. Es empfiehlt sich daher, zur Herstellung concentrirter Lösungen diesen syrupösen Rückstand mit wässrigem (ca. 60%igem) Alkohol aufzunehmen. Aus einer solchen möglichst concentrirten Lösung (aus welcher durch starke Verdünnung mit

¹⁾ Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 11, S. 40, 1892.

Derselbe, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 12, S. 230 u. ff., 1894.

²⁾ Folin a. a. O., S. 154 u. 155.

Wasser ein grosser Theil des gelösten Produktes in klumpigen Massen ausgeschieden werden kann) wird durch Hinzufügen eines grossen Ueberschusses von 95%igem Alkohol der Körper ausgefällt, abfiltrirt, abgepresst, nochmals aus der concentrirten, wässerig-alkoholischen Lösung mit Alkohol gefällt und der Niederschlag auf dem Filter mit Alkohol und Aether gewaschen. Die Ausscheidung erfolgt in schönen, weissen Flocken.

Doch ist die so erzielte Fällung niemals eine vollständige, da ein grosser Theil des Produktes selbst bei Ueberschuss von Alkohol gelöst bleibt und sich nur aus concentrirter Lösung durch Aetheralkohol einigermassen vollständig zur Abscheidung bringen lässt. Um aus dem Filtrate die nicht unbeträchtlichen Reste zu gewinnen, muss dieses eingedampft und die concentrirte Lösung durch Aetheralkohol gefällt werden. Man erhält auf diese Weise noch einen reichlichen, flockigen Niederschlag, welcher später eine compacte Masse bildet, von welcher der darüber stehende Aetheralkohol bequem abgegossen werden kann: der Niederschlag wird wiederum gründlich mit Alkohol und dann mit Aether gewaschen. Ein Mitreissen von essigsaurem Ammon aus der alkoholischen Lösung ist bei der Fällung durch Aetheralkohol, wie wir uns überzeugen konnten, nicht zu befürchten.

Beide so erhaltenen Fractionen von Protoalbumose bilden eine schneeweisse Masse, welche, längere Zeit an der Luft stehen gelassen, etwas feucht wird und zu einem Firniss eintrocknet, während sie im Vacuum über Schwefelsäure einen kreidigen, schön weissen Körper liefert, der zu einem feinen, weissen Pulver zerrieben werden kann. Sie wurden vereint untersucht.

Die Ausbeute an reiner Protoalbumose war eine geringe: sie stand weit unter der aus Witte-Pepton erhältlichen Menge Heteroalbumose und schien bei verschiedenen von Witte bezogenen Präparaten zu wechseln. Zur Beschaffung genügenden Materials für die folgenden Untersuchungen musste das käufliche Material kilogrammweise verarbeitet werden.

III. Eigenschaften und Zusammensetzung der Hetero- und Protoalbumose.

a) Löslichkeitsverhältnisse.

Die Heteroalbumose quillt stark in kaltem, salzfreiem Wasser, ist aber darin nicht völlig unlöslich, in der Hitze

löst sie sich und scheidet sich beim Erkalten zum grossen Theil wieder ab; die Protoalbumose ist in kaltem Wasser löslich, obwohl auch hier sich concentrirtere Lösungen rasch trüben und bei längerem Stehen einen schleimigen Bodensatz liefern, der sich jedoch immer wieder gut in wässerige Lösung bringen lässt. Alkohol vermag bis zu einer Verdünnung von 25 %—32 % selbst stark verdünnte Heteroalbumose in schönen Flocken niederzuschlagen, während im Gegensatze dazu die Protoalbumose selbst in 80 %igem Aethylalkohol zum grössten Theil gelöst bleibt und selbst mit Aetheralkohol aus concentrirter Lösung nicht vollkommen abgeschieden wird. Ihre Löslichkeit in wässrigem Alkohol ist viel grösser als in Wasser allein; aus diesem Verhalten erklärt sich die eigenthümliche Erscheinung, dass bei allmählichem Alkoholzusatz zu einer wässerigen Lösung der Protoalbumose regelmässig Trübungen entstehen, welche sich jedoch sofort völlig klären, wenn der Alkoholgehalt zunimmt, ebenso ist man im Stande, trübe, wässrige Lösungen durch Zusatz von etwas Alkohol vollkommen klar zu machen. In starkem Methylalkohol kann das trockene Präparat nicht in Lösung gebracht werden. Man ist berechtigt, diese Albumose als relativ alkohollöslich zu bezeichnen, insbesondere im Hinblick auf die Heteroalbumose, da das ungleiche Verhalten beider sonst anscheinend so ähnlichen Körper gegen Alkohol zu ihrer Charakterisirung besonders geeignet ist. Es mag hier darauf hingewiesen werden, dass Schrötter¹⁾ der erste war, der eine alkohollösliche Albumose unterschied, auf deren Analogien mit der isolirten Protoalbumose später noch eingegangen werden soll.

b) Verhalten gegen Reagentien.

Gegen Reagentien verhalten sich die beiden Produkte, in 4 %iger neutraler Lösung untersucht, folgendermassen:

1. Heteroalbumose.

Die in der Wärme hergestellte Lösung trübt sich in der Kälte; doch hindert die Trübung nicht die Einwirkung der Reagentien vollkommen zu erkennen.

¹⁾ H. Schrötter a. a. O.

14%ige Essigsäure klärt bei Zusatz eines Tropfens die trübe Lösung und fällt auch nicht bei Mehrzusatz; das gleiche Verhalten zeigt sie nach 5facher Verdünnung. 20%ige Salpetersäure bewirkt bei tropfenweisem Zusatz einen flockigen Niederschlag, der sich im Ueberschuss der Säure nicht löst, wohl aber bei gelindem Erwärmen, worauf er beim Erkalten wieder erscheint; aus sehr verdünnten Lösungen lässt sich jedoch mit der gleichen Säure die Heteroalbumose nicht ausfällen; die Lösungen bleiben entweder völlig klar oder zeigen nur eine schwache Opalescenz, die bei geringstem Mehrzusatz des Reagens schwindet.

Gesättigte Kochsalzlösung erzeugt, im gleichen Volumen zu der mit Essigsäure versetzten Lösung zugefügt, eine dichte Trübung, die sich in der Hitze löst, beim Erkalten wieder erscheint. Aussalzen der neutralen Lösung mit gepulvertem Kochsalz bewirkt dichte Trübung und auf Zusatz eines Tropfens Essigsäure flockige Fällung.

Baryumcarbonat wird von der heissen, wässerigen Lösung in merklicher Menge gelöst. Das so entstehende Barytsalz zeigt ähnliche Lösungsverhältnisse wie die freie Albumose.

Verdünnte Kupfersulfat- und Kupferacetatlösung geben Fällung oder Trübung, die sich in der Wärme löst und in der Kälte wieder abscheidet; Bleiacetat gibt eine dichte Trübung, die sich im Ueberschusse löst.

Metaphosphorsäure, in 1%iger und 10%iger Lösung verwandt, erzeugt einen massigen, flockigen Niederschlag, der sich im Ueberschuss löst; beim Erhitzen erfolgt nur theilweise Lösung. Ferrocyankalium gibt in der mit Essigsäure angesäuerten Lösung Trübung, Trichloressigsäure, Pikrinsäure, Gerbsäure, Jodquecksilberkalium und Salzsäure erzeugen Niederschläge, die sich in der Hitze lösen, in der Kälte wieder ausfallen. Almén'sches Reagens bewirkt Trübung, welche sich im Ueberschuss des Reagens nicht löst; Jodjodkalium, Phosphorwolframsäure und Sublimat bringen reichliche Fällungen hervor.

Millon's Reagens erzeugt einen weissen Niederschlag: beim Kochen tritt bloss eine Rothfärbung der abgeschiedenen Flocken ein, während die Lösung entweder völlig farblos bleibt,

oder sich nur schwach gelbrosa färbt. Bei der Xanthoprotein-reaction tritt schöne strohgelbe Färbung ein, die bei Zusatz von Natronlauge in ein gesättigtes Gelb umschlägt. Die Reaction von Adamkiewicz, ebenso die von Molisch bleibt vollkommen negativ; bei letzterer Reaction tritt manchmal eine sehr schwache Rosafärbung auf.

Kochen der Lösung mit Bleiacetat in alkalischer Lösung ergibt Braunfärbung der Flüssigkeit. Verdünntes Kupfersulfat und Nickelsulfat mit Natronlauge geben schön violette, resp. gelb gefärbte Lösungen.

Bei Acetylirung nach Liebermann¹⁾ bildete sich ein wenig beständiges Produkt, das anfänglich in Chloroform löslich und daraus mit Aether fällbar war, bald jedoch seine Löslichkeit in Chloroform einbüßte.

2. Protoalbumose.

Essigsäure weder in 14%iger, noch in fünffach verdünnter Lösung angewendet, bewirkt irgend eine merkliche Reaction. 20%ige Salpetersäure gibt auf tropfenweisen Zusatz eine vorübergehend auftretende Trübung: dieselbe löst sich bei geringstem Ueberschuss des Reagens, ebenso in der Wärme, in welchem Fall sie in der Kälte wiederkehrt; stärker verdünnte Salpetersäure bringt keine Trübung hervor: öfter ist erst nach Sättigung mit Kochsalz Trübung durch Zusatz von Salpetersäure zu erzielen.

Zusatz eines gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung und Ansäuern mit Essigsäure erzeugen eine Opalescenz, die sich beim Erwärmen auflöst, in der Kälte wieder erscheint. Eintragen von gepulvertem Kochsalz bis zur Sättigung der neutralen Lösung trübt dieselbe; nach Zusatz von Essigsäure erfolgt Fällung.

Baryumcarbonat wird von der kochenden wässerigen Lösung in geringer Menge gelöst.

Verdünnte Kupfersulfat- und Kupferacetatlösung erzeugen Trübungen, die in der Wärme schwinden, beim Abkühlen wieder

¹⁾ Liebermann und Hörmann. Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 11, S. 1619.

erscheinen; Bleiacetat, in verdünnter und concentrirter neutraler Lösung angewandt, gibt nur eine schwache Opalescenz.

Metaphosphorsäure in 1%iger und 10%iger Lösung erzeugt Trübungen, die im Ueberschuss des Reagens, ebenso in der Wärme gelöst werden, beim Erkalten wieder erscheinen. Ferrocyankalium trübt die mit Essigsäure versetzte Lösung; Trichloressigsäure, Pikrinsäure, Gerbsäure, Jodquecksilberkalium mit Salzsäure, Jodjodkalium erzeugen in der Hitze lösliche, beim Erkalten ausfallende Niederschläge; ebenso bringen Sublimat, Quecksilberacetat, Phosphorwolframsäure Fällungen hervor. Almén'sches Reagens erzeugt eine schwache Trübung, die sich im Ueberschusse nicht völlig löst.

Millon'sches Reagens bewirkt einen weissen Niederschlag, beim Kochen tiefrothe Färbung der Lösung und der ausgeschiedenen Flocken. Xanthoproteinreaction ergibt Gelbfärbung, auf Zusatz von Natronlauge Umschlag in Rothgelb. Adamkiewicz's Probe gibt an der Berührungszone des Reagens mit der Lösung einen schwach rosaviolett gefärbten Ring; die Reaction nach Molisch fällt negativ aus.

Die Probe auf leicht abspaltbaren Schwefel durch Kochen der Lösung mit Bleiacetat und Natronlauge ergibt Braunfärbung; Kupfer- und Nickelbiuretprobe geben violette, resp. weingelbe Färbung.

Bei der Acetylirung wurde ein relativ haltbares, in Chloroform lösliches, daraus leicht durch Ligroin und Benzol, schlechter durch Aether fällbares Produkt erhalten.

Aus den hier angeführten Reactionen ergibt sich, dass beide Produkte im Ganzen der Proto- und Heteroalbumose der früheren Untersucher entsprechen; sie weichen besonders insofern ab, als die erzielte schärfere Trennung für die Protoalbumose manche sonst beobachtete Reactionen in Wegfall bringt, die auf Beimengung von Heteroalbumose beruhen. So stellt sich vor Allem das Verhalten zu Salpetersäure anders dar, indem Protoalbumose aus salzfreien Lösungen von Salpetersäure, im Gegensatze zu den älteren Angaben, entweder gar nicht, oder äusserst unvollständig gefällt wird. Dieser Befund steht in Uebereinstimmung mit der

Angabe Folin's¹⁾ über dessen reine Protoalbumose und mit jener von E. Zunz²⁾ über das gleiche Produkt, das mittelst Zinksulfat gefällt und nach der beschriebenen Alkoholmethode gereinigt ward. Bei letzterer Darstellungsart prägen sich manche reactionelle Unterschiede (so gegen Kupfersalze und Almén'sches Reagens) noch deutlicher aus, als bei der Ammonsulfatfällung, und es möge daher auf deren Besprechung bei Zunz hingewiesen werden. Bemerkenswerth erscheint endlich, dass meine Protoalbumose mit neutralem Bleiacetat nur eine äusserst schwache Opalescenz gab, welche wahrscheinlich von einer minimalen Verunreinigung herstammte. Dieses Verhalten würde den Versuch einer Reindarstellung der Protoalbumose, wie sie Folin anstrebte, rechtfertigen. Die übrigen üblichen Fällungsreagentien der Eiweisskörper bringen allenthalben Niederschläge hervor und bieten kein besonders bemerkenswerthes Verhalten dar.

Interessantere Ergebnisse lieferten die Farbenreactionen. Einzelne von ihnen blieben auffallender Weise negativ, ein Umstand, der bei der sonst ungemein grossen Empfindlichkeit der betreffenden Reagentien gegen gewisse Gruppen werthvolle Andeutungen über das innere Gefüge der beiden Körper bot, welche in der That durch weitere Untersuchungen Bestätigung fanden. So zeigt zunächst die Millon'sche Reaction der Protoalbumose eine Besonderheit in ihrem äusserst intensiven Auftreten; im Gegensatze dazu ist die Millon'sche Reaction bei der reinen Heteroalbumose dürftig zu nennen, ein Verhalten, das für das reichliche Vorhandensein der Tyrosin gebenden Gruppe bei der Protoalbumose und deren geringe Betheiligung am Aufbau der Heteroalbumose sprach. Im höchsten Grade bemerkenswerth ist ferner der negative Ausfall der Reactionen nach Molisch und Adamkiewicz; beide gehen auch insofern parallel, als mit dem Fehlen der Molisch'schen Reaction das Ausbleiben oder ein nur spärliches Auftreten der Probe nach Adamkiewicz verbunden ist. Mit diesen beiden Fur-

1) a. a. O. S. 155.

2) E. Zunz, a. a. O. S. 244.

furolreactionen,¹⁾ insbesondere mit der Reaction nach Molisch sind erfahrungsgemäss noch verschwindende Spuren von Kohlenhydrat zu erkennen, es ist sogar wegen der enormen Empfindlichkeit der Probe bei schwächerem Ausfall ein Urtheil bezüglich des Vorhandenseins einer Kohlenhydratgruppe nur mit Vorsicht zu fällen. Um so auffallender war bei den beiden Albumosen das Fehlen der beiden Reactionen, das nach dem eben Angeführten den Mangel einer Kohlenhydratgruppe in beiden Verdauungsprodukten mit allergrösster Wahrscheinlichkeit, wenn nicht mit Sicherheit, voraussagen liess. Dabei war der negative Ausfall dieser Proben nicht etwa durch eine Dunkelfärbung der Probe in Folge des Schwefelsäurezusatzes bedingt, welche die typische rothviolette Färbung hätte verdecken können, sondern die Proben blieben nach Mischung mit der concentrirten Schwefelsäure entweder farblos oder nahmen nur einen blassgelben, seltener röthlichen Ton an. Da anderweitige Untersuchungen mit Sicherheit ergeben haben, dass das Fibrin kohlenhydrathaltig ist und mir auch die Isolirung von relativ reichlichen Kohlenhydratmengen aus anderen Verdauungsprodukten des Fibrins (s. weiter unten) gelungen ist, so ergibt sich bereits aus diesen Thatsachen, dass zwischen den beiden sogenannten « primären » Albumosen einerseits und der Muttersubstanz, sowie einzelnen weiteren Verdauungsprodukten andererseits eine wichtige Verschiedenheit der Structur gegeben ist. Bezüglich der angestellten Schwefelproben ist zu bemerken, dass beide Reactionen relativ schwach ausfielen.

c) Zusammensetzung.

Zur Analyse wurden je zwei Präparate verwendet, dieselben wurden zunächst bei 75°, dann durch 24—48 Stunden bei 105—110° getrocknet und der Analyse unterworfen; die Zahlen sind auf Proben, die bis zur Gewichtskonstanz getrocknet sind, berechnet. C und H wurden durch Verbrennen zum Theil mit Kupferoxyd bei vorgelegter Kupferspirale, zum Theil mit Kupferoxyd, Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale bestimmt; die Stickstoff-Bestimmungen wurden nach Kjeldahl jene des Schwefels nach v. Asbóth-Düring mittelst Schmelzens mit Soda und Natriumsuperoxyd ausgeführt. Die Analysen ergaben folgendes:

¹⁾ Vergl. Hofmeister, Zeitschr. für physiolog. Chemie Bd. XXIV. S. 167.

Heteroalbumose. Präparat A.

I.	0,1598 g Substanz:	0,3254 g CO ₂ ,	0,0948 g H ₂ O
II.	0,1381 „ „	0,2802 „ „	0,0829 „ „
III.	0,2842 „ „	0,05089 „ N	
IV.	0,1634 „ „	0,02919 „ „	
V.	0,1821 „ „	0,0001 „ Asche	= 0,054 %.

Präparat B.

VI.	0,1443 g Substanz:	0,2863 g CO ₂ ,	0,0872 g H ₂ O
VII.	0,1552 „ „	0,3146 „ „	0,0899 „ „
VIII.	0,1339 „ „	0,02415 „ N	
IX.	0,1411 „ „	0,02544 „ „	
X.	0,2662 „ „	0,0245 „ BaSO ₄	
XI.	0,2663 „ „	0,0227 „ „	
XII.	0,2009 „ „	0,0003 „ Asche	= 0,149 %.

Protoalbumose. Präparat A.

I.	0,1847 g Substanz:	0,3760 g CO ₂ ,	0,1103 g H ₂ O
II.	0,1670 „ „	0,3382 „ „	0,1029 „ „
III.	0,1782 „ „	0,3599 „ „	0,1032 „ „
IV.	0,2227 „ „	0,4592 „ „	0,1451 „ „
V.	0,1293 „ „	0,02239 „ N	
VI.	0,1342 „ „	0,02355 „ „	
VII.	0,1477 „ „	0,0003 „ Asche	= 0,20 %
VIII.	0,1105 „ „	0,0008 „ „	= 0,27 %.

Präparat B.

IX.	0,1582 g Substanz:	0,02798 g N	
X.	0,1366 „ „	0,02431 „ „	
XI.	0,2759 „ „	0,0260 „ BaSO ₄	
XII.	0,2514 „ „	0,0204 „ „	
XIII.	0,1298 „ „	0,0008 „ Asche	= 0,616 %.

Die aschefrei berechneten Zahlen ergaben für Heteroalbumose:

Tabelle VII.

%	I	II	III	IV	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Mittel
C	55,56	55,36	—	—	54,19	55,37	—	—	—	—	55,12
H	6,60	6,67	—	—	6,72	6,45	—	—	—	—	6,61
N	—	—	17,91	17,88	—	—	18,07	18,06	—	—	17,98
S	—	—	—	—	—	—	—	—	1,27	1,17	1,22
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19,07
											100,00

Tabelle VIII.

%	I	II	III	IV	V	VI	IX	X	XI	XII	Mittel
C	55,64	55,35	55,20	56,36	—	—	—	—	—	—	55,64
H	6,65	6,86	6,45	7,25	—	—	—	—	—	—	6,80
N	—	—	—	—	17,35	17,58	17,80	17,91	—	—	17,66
S	—	—	—	—	—	—	—	—	1,30	1,12	1,21
O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18,69
											100,00

Schon bei oberflächlicher Betrachtung dieser Analysenwerthe fällt auf, dass sie bei der Hetero-, noch mehr bei der Protoalbumose von der gewöhnlichen Zusammensetzung der nativen Eiweisskörper stark abweichen. Namentlich erscheinen die C- und N-Werthe auffallend hoch, die O-Werthe auffallend niedrig. Das könnte zu dem Verdacht Anlass geben, dass der Wassergehalt der Präparate durch allzu langes und intensives Trocknen künstlich eine Herabminderung erfahren hat. Ein solcher Verdacht wäre namentlich im Hinblick auf die seit Hofmeister¹⁾ wiederholt festgestellte Thatsache berechtigt, dass trockenes Erhitzen von Albumosen (Pepton der älteren Autoren) eine Veränderung derselben unter Wasseraustritt veranlasst. Eine solche Gefahr besteht in der That auch für die beiden untersuchten Substanzen. Durch anhaltendes Trocknen bei 115—120° werden sie allmählich gebräunt und verlieren noch eine erhebliche Menge Wasser. Ich selbst habe durch Vernachlässigung dieses Umstandes werthvolles Analysenmaterial verloren. Umsomehr war ich bedacht, diesem Uebelstand durch Abkürzung der Zeit des Trocknens und Vermeidung zu hoher Temperaturen zu steuern. Eine Veränderung der Eigenschaften der beiden Albumosen war ich trotzdem nicht in der Lage auszuschliessen — das Unlöslichwerden der Präparate. Eine solche «Coagulation» wäre eben nur durch einen Verzicht auf das Trocknen bei 110° zu vermeiden gewesen, wozu ich mich aber nicht entschliessen konnte, weil in solchem Fall meine Zahlen

1) Prager medicinische Wochenschrift, 1878.

gar nicht mit den in der Litteratur gegebenen Analysen von Albumosen und nativen Eiweisskörpern hätten verglichen werden können.

Für die Heteroalbumose des Fibrins liegen Analysenwerthe von Kühne und Chittenden vor, die ich nachstehend den meinen zur Seite stelle:

‰	Kühne u. Chittenden ¹⁾ im Mittel	Mittel aus meinen Zahlen
C	50,74	55,12
H	6,72	6,61
N	17,14	17,98
S	1,16	1,22
O	24,24	19,07

Wie man sieht, zeigt der Schwefel keine wesentliche Differenz. Um so grösser ist der Unterschied im C- und O-Gehalt. Bei der sonstigen Aehnlichkeit im Verhalten der von Kühne und von mir dargestellten Präparate muss diese Thatsache befremden. Die Erklärung dafür bietet sich darin, dass abgesehen davon, dass die Scheidung der Heteroalbumose von der Protoalbumose mittelst Dialyse unvollständig ist, auch die Trennung von den übrigen Verdauungsprodukten durch Kochsalz, wie sie von Kühne und seinen Schülern geübt worden ist, ihren Zweck nur unvollkommen erreicht. In dieser Beziehung dürfte vor allem Anderen eine Verunreinigung mit kohlenhydrathaltigen Körpern die procentische Zusammensetzung beeinflusst haben. Es gelingt wenigstens recht schwer, zumal aus der Heteroalbumose, diese Beimengung zu entfernen, die bei ungereinigten Präparaten eine so schöne Kohlenhydrat-

1) Kühne u. Chittenden, Ueber Albumosen. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 2, S. 37, 1884.

reaction hervortreten lässt, dass die Heteroalbumose darnach als kohlenhydratreich angesehen werden müsste. Ich selbst bin erst nach Combination der Salzfällung mit der Alkoholmethode auf die völlige Abwesenheit von furfuralgebenden Gruppen in der Hetero- und Protoalbumose aufmerksam geworden¹⁾, welche in dieser Beziehung dem Globin²⁾ und dem Casein³⁾ nahestehen.

Was die Protoalbumose anlangt, so ergeben auch ihre Zahlen hohe C- und N-Werthe. Die ersteren übertreffen noch die entsprechenden der Heteroalbumose und gehören wohl zu den höchsten, welche Eiweisskörper überhaupt aufzuweisen haben. Sie weichen von den sonst für Verdauungsprodukte des Fibrins gefundenen so sehr ab, dass ein Vergleich überhaupt nicht möglich ist. Von den Verdauungsprodukten anderer Eiweisskörper lassen eigentlich nur die «primären» Verdauungsprodukte des Caseins einen Vergleich zu, da wegen des Zurücktretens der Heteroalbumose und kohlenhydrathaltiger Albumosen, wie es von Alexander, zum Theil in Uebereinstimmung mit Anderen, gefunden wurde, eine Verunreinigung der Protoalbumose in dieser Richtung weniger gut möglich, daher von vornherein auch bei der Anwendung minder scharfer Trennungsmethoden ein relativ reineres Produkt leichter zu gewinnen ist.

Von den alkohollöslichen Produkten, welche Schrötter aus Witte-Pepton gewann und durch Benzoyliren und Acetyliren reinigte, entspricht eines, das durch Aether aus absolut-alkoholischer Lösung gefällt, leider noch sehr aschenreiche Acetylprodukt II in seiner Zusammensetzung annähernd der Protoalbumose.

1) In meiner ersten einschlägigen Mittheilung, a. a. O. S. 272, ist noch die Molisch'sche Zuckerprobe der Protoalbumose als «schwach positiv» angegeben, während sie in den nach dem neuen Verfahren dargestellten und genügend gereinigten Präparaten ganz fehlt.

2) Fr. N. Schulz. Der Eiweisskörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIV, S. 449.

3) Alexander a. a. O. S. 424 u. 427; ferner R. H. Chittenden. Caseoses, Caseindyspeptone and Caseinpeptone. Studies from the laboratory of physiolog. chem. Yale Univers. 3. 66—105 nach Maly, Bd. 20. S. 17. Thierfelder. Zur Kenntniss der Caseinpeptone. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. X, S. 577.

Von mir dargestellte Protoalbumose aus Fibrin	Schrötter's Albumose II ¹⁾ aus dem Acetylprodukt berechnet	Propepton I von Thierfelder ²⁾	Protoocaseose von Chittenden ³⁾	Protoalbumose von Kühne und Chittenden ⁴⁾ aus Fibrin
C 55,64	55,2	55,62 54,63	54,59	50,77
H 6,80	6,6	7,45 7,45	7,11	6,78
N 17,66	17,1	— —	15,89	17,15
S 1,21	1,5	— —	—	1,08
O 18,69	19,6	— —	—	24,22

Erwähnung verdient, dass die relative Löslichkeit der Protoalbumose in Alkohol unter den Eiweissstoffen nicht allein steht, da manche Pflanzeneiweissstoffe, so das in Wasser und Salzlösungen unlösliche, aber in 75—95%igem Alkohol lösliche Zein (Maisfibrin)⁵⁾ und die Eiweissstoffe des Klebers⁶⁾ ein ähnliches Verhalten zeigen. Bei dem hohen C- und N-Gehalt dieser Pflanzeneiweisskörper könnte sogar an nähere Beziehungen derselben zur Protoalbumose gedacht werden, doch reichen die derzeit vorliegenden Thatsachen zu weiteren Schlussfolgerungen nicht aus.

d) Bindungsweise des Schwefels.

Da die qualitative Reaction auf leicht abspaltbaren Schwefel, wenn auch nicht intensiv, so doch bei beiden Albu-

1) Schrötter, Monatshefte, Bd. 17, S. 199.

2) a. a. O. Thierfelder fällte sein Propepton I mit Alkohol aus concentrirter Lösung. Dass die «primäre» Albumose des Caseins in ihren Löslichkeitsverhältnissen in der That der Protoalbumose entspricht, ist von Alexander (a. a. O. S. 424) mit Hülfe des Alkoholverfahrens dargethan worden.

3) a. a. O.

4) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 2, S. 37, 1884.

5) Chittenden u. Osborne, A study of the proteids of the corn or maize kernel. Amer. chem. journ. 13, Nr. 78; 14, p. 65 cit. nach Maly, Bd. 22, S. 11 u. Centralbl. f. Physiol., Bd. 1892, S. 305.

6) Ritthausen cit. nach Husemann u. Hilger, Die Pflanzenstoffe, 1884, S. 1115; ferner Morishima, Ueber den Eiweissstoff des Weizenklebers. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 41, S. 345.

mosen zweifellos positiv ausfiel, ging ich daran, diesen Antheil des Schwefels quantitativ festzustellen. Es wurde dabei nach den von Fr. N. Schulz¹⁾ gegebenen Vorschriften verfahren. Statt Natronlauge wurde 30%ige Kalilauge verwendet. Davon wurden 50 ccm. nebst einigen Krystallen von reinem Bismuthum nitricum und etwas fein geraspelttem Zink zu der in ein Erlenmeyer-Kölbchen abgewogenen Substanz hinzugefügt und auf dem Sandbade mit Steigrohr ca. 11 Stunden im Kochen erhalten; die Lösung wurde dann mit Essigsäure angesäuert, filtrirt und nach gründlichem Auswaschen und Trocknen der Schwefelgehalt des Rückstands nach v. Asbóth-Düring bestimmt.

Heteroalbumose.

I.

0,2948 g Substanz : 0,0212 g BaSO₄ = 0,002916 g S.

II.

0,2981 g Substanz : 0,0246 g BaSO₄ = 0,003384 g S.

Protoalbumose.

0,2725 g Substanz : 0,0244 g BaSO₄ = 0,003356 g S.

Der Vergleich mit den Procentzahlen des Gesamtschwefels gestaltet sich daher folgendermassen:

Tabelle IX.

	Heteroalbumose		Protoalbumose	
Gesamtschwefel	1,17 %	1,27 %	1,30 %	1,12 %
Abspaltbarer Schwefel	0,99 %	1,14 %	1,24 %	

Wie man aus dieser Zusammenstellung ersieht, lässt sich aus beiden Albumosen der gesammte Schwefel — die geringen Differenzen fallen in die Fehlergrenzen des aus mehreren Operationen sich zusammensetzenden Verfahrens — als Schwefelmetall abspalten, er gehört also dem sogenannten leicht abspaltbaren Schwefel an. Dieser Befund ist vor Allem dadurch von

¹⁾ Fr. N. Schulz, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 16.

Interesse, weil er es als wahrscheinlich oder doch als möglich erscheinen lässt, dass nicht alle Bestandtheile des Fibrinmoleküls in den beiden Spaltungsprodukten vertreten sind; denn wenn auch die älteren Untersuchungen¹⁾ über die Bindung des Schwefels im Fibrin mit nicht ganz zureichenden Methoden ausgeführt sind und Versuche mit dem von Schulz benützten Verfahren fehlen, so geht doch aus später mitzutheilenden, von mir ausgeführten Untersuchungen anderer Spaltungsprodukte des Fibrins hervor, dass diese festgebundenen Schwefel im Sinne von Schulz besitzen. Vorausgesetzt, dass diese feste Bindung nicht erst unter dem Einflusse des peptischen Ferments aus einer lockeren entstanden ist, wofür vorläufig keine Wahrscheinlichkeit vorliegt, somit auch keine der beiden «primären» Albumosen bei weiterer hydrolytischer Spaltung ein Produkt mit festgebundenem Schwefel liefert, so ergibt sich, dass, falls ein solches Produkt bei der Spaltung auftritt, dieses aus einem anderen Theil des Eiweissmoleküls seinen Ursprung nehmen muss.

Durch das Fehlen des festgebundenen Schwefels wird, wenn auch nicht in dem Maasse, wie durch den Mangel einer Kohlenhydratgruppe, vorerst die Vorstellung unhaltbar, dass die Proto- und Heteroalbumose die Muttersubstanzen aller sonst auftretenden Spaltungsprodukte, somit die einzigen «primären» Verdauungsprodukte sind.

e) Bindungsweise des Stickstoffs.

Die hier folgenden Bestimmungen hatten zunächst den Zweck, zu untersuchen, ob die Proto- und Heteroalbumose in der Bindungsweise des Stickstoffs; ähnlich wie etwa beim Schwefel, eine Uebereinstimmung zeigen würden, sollten aber überdies ermöglichen, einen Ueberblick über die quantitative Vertheilung der einzelnen durch verschiedene Stickstoffbindung charakterisirten Atomgruppen in den beiden Albumosen zu gewinnen. Die Bestimmungen wurden angeregt durch die Resultate, welche

¹⁾ Vgl. Krüger, Pflüger's Archiv, Bd. 43, S. 250 u. ff., 1888.

W. Hausmann¹⁾ im hiesigen Institut bei der Untersuchung verschiedener Eiweisskörper erhalten hat, und nach der von ihm beschriebenen Methode ausgeführt.

Behufs Zersetzung wurde mit reiner, concentrirter Salzsäure durch 5—7 Stunden gekocht; die Lösungen der Heteroalbumose waren nach vollendeter Zersetzung klar, rothbraun gefärbt; ein Melanoidinniederschlag war erst nach Magnesiadestillation beim Einengen der angesäuerten Lösung sichtbar, während die Protoalbumosenlösungen bereits bei der Salzsäurezerseztung einen solchen lieferten.

Im Laufe der Bestimmungen hat es sich als zweckmässig erwiesen, die Oxydation der nach Kjeldahl zu untersuchenden Flüssigkeiten derart vorzunehmen, wie es der ursprünglichen, von Kjeldahl²⁾ bei seiner N-Bestimmung angegebenen Vorschrift entspricht. Zu der mit Kjeldahl-Säure ca. 15—20 Minuten (bis zur Dunkelfärbung) gekochten Lösung wurde nach einigem Abkühlen fein gepulvertes Kaliumpermanganat zugesetzt und dann das Erhitzen fortgesetzt; schon nach kurzem Kochen beginnt sich die Lösung aufzuhellen, und die Oxydation ist in der Regel nach 5—6 Stunden beendet. Die in anderer Weise durchgeführten Zersetzungen erwiesen sich häufig selbst nach längerem Kochen als unzureichend.

Die mit beiden Körpern vorgenommenen Bestimmungen ergaben folgende Werthe:

Tabelle X.

A. Bestimmung des Amidstickstoffs.³⁾

Substanzmenge	Menge des gefundenen NH ₃ in g	Menge des gefundenen Amid-N in g	Amidstickstoff	
			%	Mittel
Heteroalb. A { 0,9383 g	0,01239	0,0102	1,09	} 1,16
{ 1,1839 „	0,01649	0,01358	1,15	
Heteroalb. B 0,8048 „	0,01221	0,01006	1,25	} 1,26
Protoalb. B 0,7196 „	0,01101	0,009067	1,26	

1) W. Hausmann, Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII, S. 95. Herrn Hausmann bin ich für seine vielfache, liebenswürdige Unterstützung bei Ausführung der Bestimmungen zu besonderem Danke verpflichtet.

2) J. Kjeldahl, Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. XXII, S. 366.

3) Amidstickstoff im Sinne von Hausmann = leicht abspaltbarer Stickstoff = Ammoniak-Stickstoff anderer Autoren.

Tabelle XI.

B. Bestimmung des Diaminostickstoffs.¹⁾

Substanzmenge	Volumen der Gesamtlösung in ccm.	Zur Bestimmung verwendete Menge in ccm.	Menge des direkt gefundenen NH_3 in g	Diaminostickstoffmenge			
				direkt gefunden	auf die Gesamtmenge berechnet	in %	im Mittel
Heteroalb. B 0,8048 g	200	60	0,02053	0,0169	0,05635	7,00	7,00
Protoalb. B 0,7196 »	200	60	0,01281	0,01055	0,03516	4,88	4,49
0,7196 »	200	60	0,01077	0,008871	0,02956	4,11	

Tabelle XII.

C. Bestimmung des Monaminostickstoffs.

Substanzmenge	Volumen der Gesamtlösung in ccm.	Zur Bestimmung verwendete Menge	Menge des direkt gefundenen NH_3 in g	Monaminostickstoffmenge			
				direkt gefunden	auf die Gesamtmenge berechnet	in %	im Mittel
Heteroalb. A {	0,9383 g	500	0,02457	0,02024	0,1012	10,77	10,32
	0,9383 »	500	0,02093	0,01724	0,09578	10,19	
Heteroalb. B {	0,8048 »	500	0,02518	0,02073	0,08638	10,73	
	0,8048 »	500	0,02246	0,01850	0,07707	9,58	
Protoalb. B {	0,7196 »	500	0,02680	0,02207	0,09197	12,78	
	0,7196 »	500	0,02489	0,02049	0,08539	11,87	

Tabelle XIII.

D. Zusammenstellung der Mittelwerthe.

	Amid-N %	Diamino-N %	Monamino-N %	Summe	Mittel des N-Gehaltes der Substanz
Heteroalbumose.	1,16	7,00	10,32	18,48	17,98
Protoalbumose..	1,26	4,49	12,32	18,07	17,66

¹⁾ Der Diaminostickstoff (auch basischer N) entspricht dem N-Gehalt an Arginin, Lysin und Histidin und etwaigen sonstigen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Spaltungsprodukten ausser Ammoniak.

Die gleichen Werthe berechnet in Procent des N-Gehaltes des untersuchten Körpers:

	Amid-N %	Diamino-N %	Monamino-N %	Summe	Mittel des N-Gehaltes der Substanz
Heteroalbumose.	6,45	38,93	57,40	102,78	100,00
Protoalbumose.	7,14	25,42	68,17	100,73	100,00

Vorstehende Zusammenstellung lässt den tiefgreifenden Unterschied, der in dem Bau der Proto- und Heteroalbumose bestehen muss, deutlich hervortreten. Zwar besteht in Betreff des Amidstickstoffs Uebereinstimmung, wie sich denn in diesem Punkte auch aus Hausmann's¹⁾ Zahlen kein grosser Unterschied zwischen krystallisirtem Eialbumin, krystallisirtem Serumalbumin und dem Serumglobulin ergibt. Während aber die Protoalbumose annähernd ähnliche Zahlen wie diese Eiweisskörper, namentlich eine auffällige Uebereinstimmung mit dem Serumglobulin aufweist, zeigt die Heteroalbumose einen für einen thierischen Eiweisskörper ausserordentlich hohen Gehalt an basischem Stickstoff, der selbst jenen des Leims überragt, und demgemäss einen geringeren Gehalt an Monaminostickstoff. Dass übrigens die Heteroalbumose eine Sonderstellung im Eiweissmolekül besitzt, geht auch aus dem Befunde Oswald's²⁾ hervor, der bei der Pepsinverdauung des Thyreoglobulins im Gegensatze zu den übrigen dabei erhaltenen Albumosen die Heteroalbumose jodfrei fand. Inwieweit dieser Befund zu einem Schluss auf die Constitution beider Albumosen berechtigt, kann erst nach Zerlegung derselben in ihre Spaltungsprodukte, wozu eben der erste Anfang gemacht ist (s. unten), mit Nutzen erörtert werden.

IV. Spaltungsversuche.

Die mitgetheilten Beobachtungen lehren, dass zwischen Proto- und Heteroalbumose trotz des gleichen Verhaltens gegen

¹⁾ W. Hausmann a. a. O. S. 105, Tab. V.

²⁾ A. Oswald, Die Eiweisskörper der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXVII, S. 42 und 43.

Salzfällung und trotz ähnlicher Zusammensetzung deutliche, zum Theil auf einen abweichenden chemischen Bau hinweisende Verschiedenheiten bestehen. Eine nähere Aufklärung über diesen wichtigen Punkt war nur von Abbauversuchen zu erwarten. Leider ist die Gewinnung der reinen Albumosen noch immer so zeitraubend und kostspielig, dass ich für diese Versuche jedesmal nur wenige Gramm Substanz verwenden konnte. Eine weitere Schwierigkeit stand mir darin entgegen, dass für die Charakterisirung einzelner Zersetzungsprodukte der Eiweisskörper, so z. B. der Glutaminsäure und Asparaginsäure, nur recht unvollkommene Methoden zu Gebote stehen, so dass nur ein positives Resultat einen Schluss gestattet, während der negative Befund noch lange nicht das Vorhandensein solcher wenig charakterisirten Spaltungsprodukte ausschliesst. Man ist daher, ehe bessere, namentlich auch quantitative Methoden ausgemittelt werden, angewiesen, sich auf den Nachweis jener Produkte zu beschränken, welche durch Massenhaftigkeit ihres Auftretens oder Prägnanz der Reactionen die Auffindung erleichtern.

a) Spaltung durch Säure.

1. Heteroalbumose.

4 g des Präparates B wurden durch 5 $\frac{1}{2}$ Stunden mit 25 ccm. reiner concentrirter Salzsäure in einem Kölbchen mit Steigrohr auf dem Sandbade im Sieden erhalten, von dem abgeschiedenen Melanin abfiltrirt, die Lösung derart verdünnt, dass die Salzsäure ca. 5 procentig war, und mit Phosphorwolframsäure gefällt; der entstandene reichliche Niederschlag, die Diaminosäuren enthaltend, auf deren Isolirung angesichts der geringen Aussicht einer genügenden Ausbeute verzichtet werden musste, wurde nach dem Absitzenlassen von der Lösung abfiltrirt und nur das Filtrat weiter verarbeitet. In dasselbe wurde Barythydrat bis zur bleibend alkalischen Reaction eingetragen, der Niederschlag abfiltrirt, der überschüssige Baryt im Filtrat mit Schwefelsäure bei einem geringen Ueberschuss der Säure ausgefällt und die Salzsäure aus der filtrirten Lösung durch an-

dauerndes Durchleiten von heissem Wasserdampf zum grössten Theil entfernt. Die etwas eingeengte Flüssigkeit wurde dann mit Baryumcarbonat gekocht, wobei einerseits die restliche Schwefelsäure in Baryumsulfat, andererseits etwa vorhandene Glutamin- und Asparaginsäure in die alkoholunlöslichen Barytsalze verwandelt wurden, die vom Baryumsulfat und dem überschüssigen Baryumcarbonat abfiltrirte Lösung auf einige Cubikcentimeter eingedampft und mit 50—60%igem Alkohol in Schälchen gut verrieben, der schmierige Niederschlag auf dem Filter zuerst mit verdünntem, dann mit 95%igem Alkohol gewaschen und abgepresst. Aus dem alkoholischen Filtrat wurde der Alkohol auf dem Wasserbade verjagt und die Lösung bis beinahe zur Syrupdicke concentrirt. Der nach einiger Zeit durchwegs von Leucinkugeln durchsetzte Syrup wird wiederholt mit $\frac{2}{3}$ verdünntem 95%igem Alkohol extrahirt, wobei allmählich der ganze Syrup in den Alkohol übergeht bis auf einen unbedeutenden Rückstand, von dem eine Probe Millon'sche Reaction zeigt. Dieser Rest, aus ammoniakalischem Alkohol umkrystallisirt, hat ein kreidiges Aussehen und zeigt unter dem Mikroskope vereinzelte Nadeln, aber keine typischen Tyrosinformen. Die alkoholischen Auszüge, eingedampft und einzeln neuerdings mit verdünntem und ammoniakalischem Alkohol behandelt, liefern ausschliesslich Leucin in glashellen Sphäriten und gaben keine oder undeutliche Millon'sche Reaction. Proben davon in der Eprouvette erhitzt sublimiren und zersetzen sich unter typischem Geruch nach verbrennendem Leucin.

Der Rest, welcher als Tyrosin angesehen werden musste, verschwand gegenüber der Menge erhaltenen Leucins; da es jedoch wahrscheinlich schien, dass in den die Barytsalze enthaltenden Alkoholniederschlag Tyrosin übergegangen war, wurde auch dieser auf Tyrosin untersucht. Er wurde gelöst, die wässrige Lösung mit Quecksilberacetat gefällt, der voluminöse Niederschlag aufs Filter gebracht und gut nachgewaschen, das Filtrat, das allenfalls Tyrosin enthalten konnte, mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit, aus der filtrirten Lösung der Schwefelwasserstoff auf dem Wasserbade vertrieben und der geringe Rückstand nochmals in Wasser gelöst und vorsichtig ein-

geengt; auch hier fehlte Tyrosin, es krystallisirte nur etwas Leucin aus.

Der Quecksilberacetatniederschlag wurde auf Glutamin- und Asparaginsäure verarbeitet. Er wurde in Wasser suspendirt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das zum Syrup eingeeengte Filtrat unter Kühlung des Schälchens mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Selbst nach tagelangem Stehen des salzgesättigten Syrups in der Kälte gelang es jedoch nicht, eine Abscheidung von salzsaurer Glutaminsäure zu erzielen; auch ein Versuch, aus der Lösung nach Kochen mit Kupfercarbonat asparaginsaures Kupfer darzustellen, führte zu keinem Resultat; die Lösung färbte sich wohl hellblau, lieferte aber beim Einengen immer wieder einen amorphen Syrup.

Lässt das Misslingen der Abscheidung der Glutaminsäure und Asparaginsäure die Frage unbeantwortet, ob diese Aminosäuren thatsächlich fehlen, da ein Nachweis derselben auf Grund der bisher bekannten Methoden nur bei grösseren Mengen möglich ist, so liegen die Verhältnisse beim Tyrosinnachweis viel günstiger, da wegen seiner Schwerlöslichkeit die Isolirung dieses Körpers unter den Spaltungsprodukten des Eiweisses am leichtesten gelingt. Es geht daher aus dem Angeführten hervor, dass unter den Zersetzungsprodukten der Heteroalbumose neben grossen Mengen Leucin Tyrosin nicht, oder nur in sehr geringer Menge entsteht.

Unter diesen Verhältnissen drängte sich die Frage auf, ob nicht die aromatische Gruppe in der Heteroalbumose in anderer Form als der des Tyrosins vorhanden sei, und dies gab die Veranlassung zu folgendem Versuch:

3 g desselben Präparates wie vorher wurden in verdünnter Kalilauge gelöst, mit Kaliumpermanganat in Substanz versetzt und behufs Beschleunigung der Oxydation auf dem Sandbade bei 35—40° gehalten; nach Absitzen des entstandenen Braunsteinniederschlags wurde zu der nunmehr entfärbten Lösung wiederum Permanganat zugesetzt und dies in der gleichen Weise durch einige Tage wiederholt, bis die Lösung nach Permanganatzusatz sich nicht mehr entfärbte, die Oxydation also beendet war. Die roth gefärbte alkalische Lösung wurde

nahmen dem massenhaften Niederschlage abwärts, mit Benzoesäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt; nach Verdunsten desselben bei Zimmertemperatur hinterblieb ein relativ reichlicher, krystallinischer Rückstand, der typischen Benzoesäuregeruch aufwies. Der Körper wurde aus heissem Wasser und aus Aether umkrystallisirt und stellte gereinigt weisse, in Wasser unlösliche, leicht in Aether lösliche Schüppchen dar, die beim Erhitzen unter Entwicklung von charakteristischem Geruch schmolzen und sublimirten. Bei Erwärmen mit Methylalkohol und concentrirter Schwefelsäure trat Geruch nach Benzoessäuremethylester ein, ebenso mit Aethylalkohol und concentrirter Schwefelsäure nach Benzoessäureäthylester; beim Verdampfen mit concentrirter Salpetersäure entwickelte sich Nitrobenzolgeruch; die durch Neutralisiren mit Ammoniak hergestellte Ammoniumverbindung gab mit Eisenchlorid einen flockigen, rothgefärbten Niederschlag. Der bei der Oxydation der Heteroalbumose entstandene Körper war somit Benzoessäure, und da diese bei der Oxydation von Tyrosin nicht entstehen dürfte, so weist dieser Befund auf einen anderen nicht im Kern hydroxylierten aromatischen Complex hin, etwa die von Schulze und Barbieri¹⁾ aufgefundene Phenylamidopropionsäure.

Die Uebereinstimmung, welche in einigen Punkten zwischen der Heteroalbumose und dem Glutin gegeben ist, hoher Gehalt an Diaminostickstoff, Abwesenheit von Tyrosin und Indol (s. unten) liefernden Complexen, sowie der Kohlenhydratgruppe,²⁾ legten eine Untersuchung der mit Säure erhaltenen Spaltungsprodukte der Heteroalbumose auf Glycocoll nahe. Herr Privatdocent Dr. Spiro, welcher zum Nachweis von Glycocoll unter den Zersetzungsprodukten der Eiweissstoffe ein empfindliches, auf Benzoylirung und Condensation der ge-

¹⁾ E. Schulze, Untersuchungen über die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweissstoffe durch Salzsäure und durch Barytwasser entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 72.

²⁾ Glutin gibt zwar Molisch's Reaction, doch ist es bisher nicht gelungen, daraus osazonlieferndes Kohlenhydrat abzuspalten (Krawkow. Pflüger's Archiv, Bd. 65, S. 281).

bildeten Hippursäure mit Benzaldehyd sich gründendes Verfahren ausgearbeitet hat, vermochte in der That mit demselben unter den Spaltungsprodukten von mir dargestellter reiner Heteroalbumose reichlich Glycocoll nachzuweisen.¹⁾

2. Protoalbumose.

1 g des Präparats B wird in gleicher Weise wie die Heteroalbumose zersetzt; die erhaltene dunkelgefärbte Lösung wird mit Wasser entsprechend verdünnt und mit Phosphorwolframsäure gefällt; auch hier wird der Niederschlag nicht weiter verarbeitet. In das Filtrat wird Barythydrat bis zur bleibend alkalischen Reaction eingetragen, dabei die Phosphorwolframsäureabscheidung durch längeres Erwärmen auf dem Wasserbade beschleunigt und in der filtrirten Lösung der Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt. Nach Abscheidung des Baryumsulfats wird durch wiederholtes Einengen der Lösung auf dem Wasserbade ein grosser Theil der Salzsäure verjagt und der Rest durch Schütteln mit Silberoxyd als Chlorsilber ausgefällt. Aus dem Filtrat wird das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt, dieser in der filtrirten Lösung durch Eindampfen verjagt und der erhaltene Syrup mit ca. 60%igem, schwach ammoniakalischem Alkohol in 2 ziemlich gleich starke Fractionen zerlegt. Der nicht in den Alkohol übergegangene Antheil stellt nach dem Eintrocknen eine weisse kreidige Masse dar, die nach zweimaligem Umkrystallisiren aus ammoniakalischem Alkohol ausschliesslich aus typischen Tyrosinkrystallen theils in Garbenform, theils in aggregirten dunklen Kugeln besteht; die Krystalle geben in ausgesprochenster Weise sowohl die Millon'sche, als auch die Piria'sche Reaction. Die verdünnt alkoholische Lösung zeigt nach dem freiwilligen Eindunsten unter dem Mikroskope beinahe ausschliesslich opake Kugelaggregate; beim Umkrystallisiren aus ammoniakalischem Alkohol scheiden sich zunächst krystallinische Häute an der Flüssigkeits-

1) Vergl. diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 186.

oberfläche, bei weiterem Auskrystallisiren dunkle, aus Nadelchen bestehende Garben und Kugeln, dagegen keine charakteristischen Leucinformen aus. Dass die Ausscheidung aus Tyrosin bestand, wurde nach weiterer Reinigung durch die Millon'sche Probe erwiesen. Dass übrigens auch Leucin, wenn auch in geringer Menge, vorhanden war, wird dadurch wahrscheinlich, dass eine Probe des Krystallbreis in der Eprouvette erhitzt ein Sublimat und deutlichen Geruch nach verbrennendem Leucin entwickelte. Auf andere eventuell in der Mutterlauge befindliche Spaltungsprodukte konnte der geringen Menge wegen nicht untersucht werden. Während bei allen tyrosinliefernden Eiweisskörpern unter den Zersetzungsprodukten das Leucin die bei Weitem überwiegende Hauptmasse bildet, tritt hier das Tyrosin derart hervor, dass ihm unter den sonst noch vorhandenen Aminosäuren der Hauptantheil zufällt. Hält man dem gegenüber, dass bei der Heteroalbumose sich Tyrosin höchstens in Spuren auffinden lässt, so ist die Vermuthung berechtigt, dass die beiden Produkte nicht auseinander, sondern unabhängig von einander entstehen. Herr Dr. Spiro untersuchte auch die Protoalbumose auf Glycocoll, doch mit negativem Erfolg.

b) Einwirkung von schmelzendem Kali.

Eine Probe von Heteroalbumose, in schmelzendes, etwas wasserhaltiges Kalihydrat eingetragen, löst sich zuerst in der Schmelze, wird dann aber anscheinend durch das Kali wieder ausgefällt. Weder bei kürzerem, noch bei längerem Schmelzen kann Indol- oder Skatolgeruch wahrgenommen werden; löst man die Schmelze in Wasser, so tritt ein äusserst schwacher Indolgeruch auf; nach Uebersättigung mit Schwefelsäure entwickelt sich ein intensiver Geruch nach niederen Fettsäuren. Pyridingeruch wurde nicht beobachtet.

Die Protoalbumose löst sich leicht in der Schmelze und gibt sogleich den intensivsten Indol- und Skatolgeruch; nach Wasserzusatz und Ansäuern mit Schwefelsäure tritt auch hier derselbe Fettsäuregeruch auf, doch bedeutend schwächer als

bei der Heteroalbumose; Pyridin wurde auch hier nicht bemerkt.

Die Ergebnisse der Kalischmelze stimmen gut überein mit den früher gemachten Befunden; die Heteroalbumose entspricht in ihrem Verhalten jenen Proteinstoffen, welche, wie der Leim, in ihrem Molekül kein Tyrosin besitzen und weder bei der Kalischmelze noch bei der Fäulniss Indol oder Skatol liefern. Die Protoalbumose steht dagegen den echten Eiweisskörpern, welche die Abspaltung von Indolderivaten gestatten, näher.

c) Spaltung durch Verdauungsfermente.

An die Untersuchung der tiefgreifenden Einwirkung von Säure und Alkali schliesst sich zweckmässig die Betrachtung der fermentativen Spaltung an, welche zu der Muttersubstanz näher stehenden Abbauprodukten führt. Die bei der Verdauung der Proto- und Heteroalbumose gebildeten Produkte habe ich durch ihr Verhalten gegenüber der fractionirten Aussalzung mit Ammonsulfat charakterisirt.

a) Pepsinverdauung.

1. Heteroalbumose.

1 g Heteroalbumose B wurde in 100 ccm. 3⁰/₁₀₀iger Salzsäure gelöst, mit etwas Pepsin¹⁾ versetzt und im Brutschrank bei einer Temperatur von 35—40° gehalten; die Lösung der Heteroalbumose erfolgte rasch, und das Verdauungsgemisch stellte eine klare, gelb gefärbte Lösung dar; die Verdauung begann am 7. III. Die in bestimmten Zeiträumen entnommenen Proben wurden neutralisirt, aufgekocht und mit Ammonsulfat fractionirt; es ergab sich Folgendes:

¹⁾ Angewendet wurde Pepsinum purissimum (Grübler) und zwar das gleiche Präparat, das sich bereits mehrfach sehr gut bewährt hatte, und dessen Beschaffenheit von Umber kurz besprochen worden ist. Vergl. Umber a. a. O., S. 262.

Tabelle XIV.

Verdauungs- dauer	$\frac{1}{2}$ -Sättigung	$\frac{1}{2}$ -Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz ¹⁾ zur gesättigten Lösung	Albumosen- freies Filtrat
24 Stunden	Opaleszenz; nach einigem Stehen flockige Aus- scheidung	starke Opaleszenz	starke Opales- cenz und Aus- scheidung von dunklen, dichten Flocken, die sich bei längerem Stehen noch vermehrten	die Lösung bleibt voll- ständig klar	schön violett gefärbte Biuret- reaction: keine Reaction nach Molisch. auf Jodjod- kaliumzusatz starke Fällung

Genau das gleiche Bild zeigen die nach 2, 3 und 5 Tagen entnommenen Proben.

15 Tage	Opaleszenz; beim Stehen über Nacht Flocken; auf Zusatz von 30% Alkohol nach einigem Stehen flockige Abscheidung	starke Opaleszenz und flockige Ausscheidung	dichte Trübung	klar	Biuret- reaction positiv. Molisch's Reaction negativ: starke Fällung auf Jodjod- kaliumzusatz
---------	--	--	-------------------	------	---

Am 30. III., also nach 3 Wochen, wurde die Verdauung abgebrochen, die Verdauungslösung neutralisirt, auf dem Wasserbade bis auf einige Cubikcentimeter eingengt und mit 80%igem Alkohol gefällt: der reichliche, flockige Niederschlag von der alkoholischen Lösung abfiltrirt und Niederschlag, sowie Filtrat getrennt behandelt. Der Niederschlag wurde abgepresst, in Wasser gelöst, nochmals neutralisirt und in ca. 5%iger Lösung mit Ammonsulfat in folgende Fractionen zerlegt:

¹⁾ Verdünnte Essigsäure, Tropfen für Tropfen zugesetzt.

$\frac{1}{2}$ -Sättigung	$\frac{2}{3}$ -Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur gesättigten neu- tralen Lösung	Albumosen- freies Filtrat
dichte Trübung, nach längerem Stehen flockige Abscheidung	starke Trübung und Ausscheidung in Schlieren; nach kurzem Stehen starker flockiger Niederschlag	starke Trübung und Abscheidung in reichlichen Flocken	schwache, aber deutliche Opalescenz	rothe Biuret- reaction, keine Mo- lisch'sche Reaction; Lugol'sche Lösung, sowie Jod- quecksilber- kalium gaben Fällungen

Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingedampft, wobei ein verhältnissmässig nur geringer Trockenrückstand zurückblieb; dieser wurde in Wasser gelöst, neutralisirt und wie der Niederschlag mit Ammonsulfat behandelt.

$\frac{1}{2}$ -Sättigung	$\frac{2}{3}$ -Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur gesättigten neu- tralen Lösung	Albumosen- freies Filtrat
Spur Opalescenz	flockiger Niederschlag	dichte Trübung und Ausscheidung in Schlieren und Flocken	keine Trübung	Biuret- reaction schön roth; keine Mo- lisch'sche Reaction; Fällung mit Jodjodkalium und Jod- quecksilber- kalium

Von den Ergebnissen dieser Verdauungsversuche scheint zunächst der langsame Abbau der Heteroalbumose durch Pepsin bemerkenswerth. Selbst dreiwöchentliche Verdauung in 1%iger Lösung war nicht im Stande, ein völliges Verschwinden derselben herbeizuführen, obwohl bereits nach den ersten 24 Stunden deutlich Zerfall in weitere Abbauprodukte erfolgt war. Diese beiden, scheinbar sich widersprechenden Thatsachen finden vermuthlich ihre Erklärung in der allmählichen Abschwächung der Fermentwirkung durch die zunehmende Menge der Verdauungsprodukte.

Als bei der Verdauung der Heteroalbumose entstehende Spaltungsprodukte ergaben sich: eine geringe Menge eines bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung der heteroalbumosenfreien Lösung sich abscheidenden Körpers, der mit Bleiacetat in alkalischer Lösung gekocht Schwefelblei abscheidet (A_h); ein zweiter, wie es scheint in grosser Menge vorhandener (B_h), fällt aus bei Sättigung des neutralen Filtrats von A_h ; von beiden Körpern wird ein erheblicher Theil in 80%igem Alkohol aufgenommen; endlich lässt sich nach Abscheidung von B_h durch vorsichtiges Ansäuern des Filtrates eine immer nur in Spuren nachweisbare Substanz C_h ausfällen. Die nach Abscheidung dieser Albumosen erhaltene Lösung enthält durch Jodquecksilberkalium und Jodjodkalium fällbare Körper von der Beschaffenheit des Peptons B; auch von diesen lässt sich, und zwar wahrscheinlich der allergrösste Theil in 80%igem Alkohol lösen. Pepton A, das, wie anderweitig gezeigt werden soll, ein Spaltungsprodukt einer kohlenhydratreichen Albumose B darstellt, war niemals vorhanden: dies ging aus dem negativen Ausfall der äusserst empfindlichen Reaction nach Molisch hervor.

Wie man sieht, entstehen bei der peptischen Verdauung der Heteroalbumose Verdauungsprodukte, die in ihrem Verhalten gegen Salz und Alkohol den Deuteroalbumosen A, B und C (Spuren) und dem Pepton B entsprechen. Eine Identität der so erhaltenen Produkte, namentlich der Albumosen, mit den aus Fibrin direkt entstandenen anzunehmen, wäre jedoch unstatthaft. Das Fehlen der Kohlenhydratgruppe in dem Molekül der Heteroalbumose schliesst bei ihr die Entstehung kohlen-

hydrathaltiger Verdauungsprodukte, z. B. der Albumose B, wie sie aus Witte-Pepton zu isoliren ist, einfach aus. Aber auch die Bildung indol- und skatolliefernder Derivate wird durch das entsprechende Verhalten der Heteroalbumose unwahrscheinlich.

Da von vornherein die Möglichkeit nicht ausgeschlossen war, unter den Verdauungsprodukten der Heteroalbumose auch Protoalbumose zu finden, wurde deren Nachweis in der oben angeführten Weise versucht. In dem mit 80%igem Alkohol ausgezogenen Theil der Verdauungslösung der Heteroalbumose liess sich nach Verjagung des Alkohols durch $\frac{1}{2}$ -Sättigung mit Ammonsulfat nur eine schwache Opalescenz erzeugen, die in gar keinem Verhältniss, weder zu den Resten der unverdauten Heteroalbumose, noch auch zu der Menge der übrigen Spaltungsprodukte stand und wohl nur als Verunreinigung seitens einer anderen Fraction gedeutet werden kann; auch ergaben in früheren Verdauungsphasen entnommene Proben mit 30%igem Alkohol Fällungen, die der Menge nach der Salzfällung bei $\frac{1}{2}$ -Sättigung vollkommen entsprachen und nur auf die Anwesenheit unveränderter Heteroalbumose zu beziehen waren. Es darf demnach als sicher angenommen werden, dass nennenswerthe Mengen der Protoalbumose aus Heteroalbumose nicht entstehen, ein Befund, der mit der oben angeführten Beobachtung Oswald's¹⁾ bezüglich der Albumosen des Thyreoglobulins in voller Uebereinstimmung steht.

2. Protoalbumose.

Das Verfahren war hier das gleiche wie bei der Heteroalbumose. 1 g der Protoalbumose B wird am 7. III. in 100 ccm. 0,3%iger Salzsäure vertheilt mit Pepsin versetzt und bei 35—40° verdaut; das Präparat löst sich in der Salzsäure leicht auf, und die schön hellgelb gefärbte Lösung bleibt bis zum Schlusse des Versuches völlig klar und ohne Bodensatz. Die einzelnen Proben ebenso behandelt, wie bei der Heteroalbumose, zeigten folgendes Verhalten:

1) Siehe S. 257.

Tabelle XV.

Verdauungs- dauer	$\frac{1}{2}$ -Sättigung	$\frac{2}{3}$ -Sättigung	Ganzsättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur gesättigten neutral. Lösung	Albumosen- Filtrat
24 Stunden	Trübung und	starke Opalescenz ¹⁾	gleichmässige	klar	rothgefärbte
2 Tage	Abscheidung	schwache „ ¹⁾	Opalescenz	„	Biuret-
3 „	eines flocki-	„ „ ¹⁾	und Ausschei-	„	reaction
5 „	gen Nieder- schlages	starke „ ¹⁾	dung von dichten, dunk- len, klebrigen Flocken	„	Molisch's Reaction ne- gativ; mit Lugol'scher Reagens er- folgt Fällung
15 „	Fällung; (eine Probe mit 45% Alkohol ver- setzt, bleibt selbst nach mehrtägigem Stehen klar)	starke Opalescenz; bei längerem Stehen ker- niger Nieder- schlag	dichte Trübung •	„	der gleiche Befund
24 „	Opalescenz; später Ab- scheidung von Flocken	flockiger Nie- derschlag; das Filtrat gibt keine Mo- lisch'sche Reaction	Trübung; nach längerem Stehen flockige Ab- scheidung; dieselbe gibt keine Mo- lisch'sche Reaction	„	schöne Biuret- reaction. Jodquecksilber- kalium + HCl gibt Trübung, welche sich in der Wärme löst, ebenso im Ueber- schuss der Säure. Jod- kalium eine reichliche Niederschlag Molisch's Reaction bleibt negativ
58 „	schwache Opalescenz	starker, schön flockiger Niederschlag	der gleiche Befund wie oben	„	„

1) Nach längerem Stehen flockiger Niederschlag.

Bei Ueberblick dieser Tabelle ersieht man zunächst eine gewisse Aehnlichkeit mit dem peptischen Abbau der Heteroalbumose. Auch hier erfolgte keine völlige Verdauung des Präparates, ja es scheint, wie aus den beträchtlichen Niederschlägen bei Halbsättigung zu entnehmen ist, dass die Verdauung noch langsamer fortschritt, als bei der Heteroalbumose; sie war nach ungefähr achtwöchentlicher Verdauungsdauer noch nicht vollständig. Von den gebildeten Produkten erfolgte eine reichliche Ausscheidung eines Körpers bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung (A_p), eine dem gegenüber spärliche bei voller Sättigung der neutralen Lösung (B_p); der erstere, in verdünntem Alkohol löslich, gab selbst in concentrirterer Lösung beim Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge nur eine schwache Braunfärbung, der letztere erwies sich nach dem Verhalten gegen die Mølich'sche Reaction kohlenhydratfrei. Durch Säurezusatz konnte in dem Filtrat von B_p niemals eine Reaction erzielt werden; es fehlte sonach der der Albumose C analoge Körper. Das nach Ausfällung der Lösung mit Ammonsulfat und Säure erhaltene Filtrat enthielt keinen Körper von der Beschaffenheit des Pepton A, dagegen andere Produkte peptonartigen Charakters, wie dies die intensive Biuretreaction anzeigte. Der Zusatz von Jodjodkalium brachte einen auffallend reichlichen Niederschlag hervor. Es ist natürlich, dass, wie bei der Heteroalbumose, auch hier die Verdauungsprodukte von dem Charakter der Muttersubstanz abhängig sind. Dies gilt zunächst von dem Mangel der Kohlenhydratgruppe. Dann aber muss der so reichlich in der Protoalbumose vorhandenen tyrosingebenden Gruppe bei der Beurtheilung der Eigenschaften der einzelnen Derivate eine wichtige Rolle zugesprochen werden; schon aus diesem Grunde ist trotz des ähnlichen Verhaltens bei der Salzfüllung ein Unterschied wenigstens für bestimmte, sonst einander entsprechende Verdauungsprodukte beider Albumosen zu erwarten.

β) Trypsinverdauung.

1. Heteroalbumose.

I. Hier sei zunächst ein Verdauungsversuch angeführt mit einem älteren Präparat, dessen Darstellung sich von den

analysirten Produkten dadurch unterschied, dass seine Reinigung statt mit 30%igem mit 47%igem Alkohol erfolgt war. 1 g dieser Heteroalbumose wurde in 100 ccm. H₂O, das mit einigen Tropfen einer halbverdünnten Sodalösung alkalisch gemacht worden war, gelöst und mit 5 ccm. einer gut wirksamen Trypsinlösung versetzt, am 24. X. in den Brutschrank bei 35—40° eingestellt, nachdem zu der Lösung noch Chloroform hinzugefügt worden war. Nach 1 1/2 tägiger Verdauung wurde die eine Hälfte der Lösung neutralisirt, aufgeköcht und mit Ammonsulfat geprüft.

Tabelle XVI.

1/2-Sättigung	2/3-Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur gesättigten neutralen Lösung ¹⁾	Albumosenfreies Filtrat ²⁾
keine Opaleszenz oder sonstige Abscheidung	Diffuse Trübung; nach tagelangem Stehen ein geringer aus Tropfen und Globuliten bestehender Bodensatz	geringe flockige Abscheidung	klar	Biuretreaction { violett- roth Molisch's Reaction { ne- Adankiewicz's } gativ Jodquecksilber- kalium { Nieder- Jodjodkalium } schlag Gerbsäure

Die Heteroalbumose war also nach 1 1/2 tägiger Verdauung vollkommen verschwunden. Neben dem Auftreten von Albumosen, welche der Salzfällbarkeit nach mit den bei der Pepsinverdauung gefundenen übereinstimmen, ist die Entstehung von nicht unerheblichen Mengen peptonartiger Körper bemerkenswerth; auch hier blieben die Kohlenhydratreactionen negativ: die bei Säurezusatz zu der ammoniumsulfatgesättigten Lösung ausfallende Albumose C war hier nicht nachweisbar.

Nach 4 wöchentlicher Verdauung wird die 2. Hälfte der Verdauungslösung neutralisirt und auf dem Wasserbade zum

¹⁾ Das Ansäuern erfolgte mit ammoniumsulfatgesättigter 1/10 N-Schwefelsäure.

²⁾ Die Hauptmasse des Ammonsulfates wurde durch Fällung mit Alkohol in ammoniakalischer Lösung entfernt und nach Verjagung des Alkohols der Trockenrückstand in Wasser aufgenommen.

Syrup eingedampft; derselbe gibt eine deutliche Biuret-, eine schwache Millon'sche¹⁾ Reaction, mit Phosphorwolframsäure entsteht eine reichliche Fällung; Reduction alkalischer Kupferlösung erfolgt nicht, auch der Nachweis von Tryptophan mit verdünntem Bromwasser gelingt nicht. Aus dem Syrup kann der Hauptmasse nach Leucin neben etwas Tyrosin²⁾ isolirt werden, ausserdem leicht zerfliessliche, verbrennliche Krystalle in Form von tetragonalen Pyramiden und von Wetzsteinen, deren nähere Identificirung nicht möglich war.

II. 3 g der Heteroalbumose B wurden in 3^{0/100}iger Sodalösung mit 5 ccm. einer mässig concentrirten Trypsinlösung unter Toluolzusatz der Verdauung im Brutschrank bei 35—40° unterworfen. Das Trypsinpräparat, das gleiche wie im vorherigen Versuch, entstammte einer mehr als 1^{1/2} jährigen Pankreas-selbstverdauung, gab keine Biuret- und Millon'sche Reaction mehr, mit verdünntem Bromwasser nur eine äusserst schwache Opalescenz und erwies sich noch immer als sehr gut wirksam; der Versuch wurde am 1. II. angesetzt und am 27. III. abgebrochen. Da die Lösung eine intensive Biuretreaction zeigte, wurde ein Theil derselben in der gewöhnlichen Weise mit gesättigter Ammonsulfatlösung in einzelne Fractionen zerlegt:

1/2-Sättigung	2/3-Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur gesättigten, neu- tralen Lösung	Albumosenfreies Filtrat
klar	klar	dichte Trübung und Abscheidung von Flocken	deutliche Trübung	Biuretreaction { purpur- farben Molisch's Reaction { ne- gativ Jodjodkalium: massen- hafte Fällung.

Verdünntes Bromwasser:

theils erfolgt überhaupt keine Reaction, theils nur eine schwach violette Färbung der Probe und Absetzen eines spärlichen violetten Niederschlags. Das gleiche Resultat liefert der Zusatz von stärkerem Bromwasser.

1) Es tritt nur eine schwache Fleischrothfärbung der Flocken ein, die Lösung selbst bleibt farblos.

2) Die Verunreinigung mit tyrosingebenden Körpern war bei diesem mit 47^{0/100} igem Alkohol dargestellten Präparat grösser, als bei Produkten späterer Darstellung.

Die Hauptmasse der Lösung wird mit Salzsäure schwach angesäuert und mit Phosphorwolframsäure zur Entfernung von Albumosen sammt den eventuell gebildeten Diaminosäuren ausgefällt. Es setzt sich ein reichlicher Niederschlag ab; in der von diesem abfiltrirten Lösung wird die Phosphorwolframsäure mit Barythydrat entfernt, der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt und die Salzsäure durch wiederholtes Eindampfen der Lösung, zuletzt mit Silberoxyd als Chlorsilber entfernt; das silberhaltige Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt und dieser endlich aus der filtrirten Lösung auf dem Wasserbade verjagt. Die Hauptmasse des so erhaltenen Syrups wird von hellen Leucinkugeln dargestellt; daneben lässt sich nach wiederholtem Ausziehen mit schwachem Alkohol und Umkrystallisiren aus ammoniakalischer, alkoholischer Lösung eine sehr geringe Menge von Tyrosin in typischen Büscheln erhalten. Die Mutterlauge der Leucin- und Tyrosinkristalle war in Methylalkohol leicht löslich, doch einer weiteren Untersuchung nicht mehr zugänglich. Entsprechend dem Reichthum der Heteroalbumose an Diaminosäuren, zum Theil wohl auch wegen der hier noch vorhandenen, nicht völlig durch Trypsin aufgespaltenen Albumosen war der grösste Antheil der Spaltungsprodukte in den Phosphorwolframsäureniederschlag übergegangen, sodass für die genauere Untersuchung der an und für sich spärlich vorhandenen Aminosäuren das vorhandene Material nicht mehr ausreichte.

Von den Resultaten dieses 2. Verdauungsversuches erscheint am auffallendsten, dass trotz zweimonatlicher Trypsinverdauung, sowohl mit Ammonsulfatsättigung in neutraler Lösung, als auch in ammonsulfatgesättigter Lösung mit Säure Albumosen auszufällen waren. Sowohl Kühne und Chittenden,¹⁾ als auch Neumeister²⁾ fanden bei der Trypsinverdauung der Heteroalbumose regelmässig eine Abscheidung von sogenanntem «Antialbumid», einem Körper, der «am schwersten

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie, N. F. Bd. 1, S. 197; ferner daselbst N. F., Bd. II, S. 47.

²⁾ Zeitschr. f. Biologie, N. F., Bd. 5, S. 387.

und nur unter besonderen Bedingungen» (bei relativ stark alkalischer Reaction [in 3⁰/oiger Sodalösung]) vom Trypsin angegriffen wird. Bei meinen Versuchen trat eine solche Antialbumidbildung nicht auf; es ist aber wohl möglich, dass die beiden gegen Trypsin so widerstandsfähigen Körper mit jenem Produkte in Beziehung stehen, welches Neumeister als Antideuteroalbumose bezeichnete, und das als Abkömmling des Antialbumids angesehen wurde; die intensive Biuretreaction nach Ausfällung der Albumosen scheint die alte Annahme Kühne's und seiner Schüler zu bestätigen, dass die Heteroalbumose neben durch Trypsin leicht abspaltbaren Gruppen solche besitzt, die der Trypsineinwirkung, wenngleich nicht absoluten, so doch relativ grossen Widerstand zu leisten vermögen und in diesem Sinne die Unterscheidung eines «Anticomplexes» rechtfertigen.¹⁾ — Unter den Reactionen der albumosenfreien Verdauungslösung ist beachtenswerth der Ausfall der Bromreaction. Während in dem ersten Verdauungsversuch durch Bromwasser überhaupt keine Färbung auftrat, war bei dem zweiten Violettfärbung, aber nur sehr schwach zu erhalten. Kühne und Chittenden²⁾ fanden bei der Trypsinverdauung der Heteroalbumose die violette Bromreaction sehr intensiv, vermissten sie dagegen bei Verdauung der aus der Heteroalbumose erhaltenen Körper der Antigruppe. — In Uebereinstimmung mit den früheren Befunden war auch bei den Trypsinverdauungsprodukten durchweg die Abwesenheit der Kohlenhydratgruppe zu constatiren.

2. Protoalbumose.

Am 14. I. wurde 1,8 g des Präparats B in 200 ccm. 3⁰/oiger Sodalösung mit der schon früher angewandten Trypsinlösung unter gleichzeitigem Toluolzusatz versetzt und bei 35—40° verdauen gelassen. Bereits nach 24 Stunden ist der grösste

¹⁾ Vgl. Chittenden, Mendel u. Henderson, A chemico-physiological study of certain derivates of the proteids. American Journ. of Physiology Vol. II. January 18, 1899, Nr. II.

²⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. 1, 1883, S. 195; ferner Bd. 2, 1884, S. 46 und 47.

Theil der Protoalbumose wegverdaut, denn eine Probe gibt nach vorheriger Neutralisation bei Halbsättigung mit Ammonsulfat nur noch eine schwache Opalescenz; nach 2 Mal 24 Stunden wird ein Theil der Verdauungslösung neutralisirt, aufgeköcht und wie früher mit Ammonsulfat gefällt.

Tabelle XVII.

$\frac{1}{2}$ -Sättigung	$\frac{2}{3}$ -Sättigung	Sättigung der neutralen Lösung	Säurezusatz zur ammoniumsulfat-gesättigten Lösung	Albumosenfreies Filtrat
klar	erst bei Erreichen der oberen Grenze des Salzzusatzes Opalescenz	Trübung und Ausscheidung in schmierigen Flocken	klar	schwache, aber deutliche Biuret-reaction; Jodquecksilberkalium und HCl gaben nur schwache Opalescenz, ¹⁾ Jodjodkalium einen Niederschlag; Molisch's Reaction negativ.

Man sieht, dass die Spaltung durch Trypsin in den ersten Stadien im allgemeinen ebenso erfolgt, wie bei der Pepsinverdauung;²⁾ wie dort lassen sich auch hier 2 Fractionen, eine bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung, die andere bei voller Sättigung der neutralen Lösung gewinnen, während durch Säurezusatz in beiden Fällen keine Abscheidung erfolgt: dass gleichzeitig Körper entstanden

¹⁾ Siehe W. Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 11, S. 323.

²⁾ Neumeister (Zeitschr. f. Biologie, Bd. 5, S. 387) erhielt bei der Trypsinverdauung der Kühne'schen «Protoalbumose» nur sehr geringe Mengen von Deuteroalbumose; dieser Umstand wird zum Theil dadurch erklärt, dass die Kühne'sche Protoalbumose entsprechend ihrer Darstellung selbst noch ein Gemenge von Protoalbumose und durch NaCl in neutraler und saurer Lösung fällbarer Deuteroalbumosen darstellt; diese letzteren mussten während der Zerlegung der «Protoalbumose» ebenfalls Spaltung in weitere Produkte erfahren haben und konnten daher überhaupt nicht oder nur in Resten nachgewiesen werden.

sind, denen nicht mehr der Charakter der Albumosen zukommt, geht aus den mit dem albumosenfreien Filtrat angestellten Reactionen deutlich hervor; auch hier sei auf den Mangel der Kohlenhydratgruppe entsprechend dem negativen Ausfall der Reaction von Molisch verwiesen.

Die Verdauung des zweiten Theiles wurde am 30. III. unterbrochen; die klare, gelb gefärbte Lösung gab keine Spur einer Biuretreaction mehr. Die Lösung wurde zu einem dünnflüssigen Syrup eingeengt und der Krystallisation überlassen; der nach dem Eindunsten entstandene dicke Krystallbrei wurde wiederholt mit ca. 50%igem Alkohol extrahirt. Diese Auszüge enthielten neben Spuren von Leucin reichlich Tyrosin, der die Hauptmasse darstellende, alkoholunlösliche Theil beinahe ausschliesslich Tyrosin; ausserdem gab jedoch die Mutterlauge mit Bromwasser einen voluminösen, gelb gefärbten, flockigen Niederschlag, aber keine Violett- oder Rothfärbung der Lösung; auch auf Zusatz von Phosphorwolframsäure erhielt man eine Fällung.

Hieraus erhellt, dass die Protoalbumose durch länger dauernde Trypsineinwirkung vollständig, ohne einen Biuretreaction gebenden Körper zu liefern, in einfachere Produkte, wie Aminosäuren und Diaminosäuren zerlegt wird. Die Abwesenheit eines die Biuretreaction gebenden Körpers,¹⁾ eines Antipeptons im Sinne Kühne's, bei dieser Spaltung der Protoalbumose erscheint mit Bezug auf die Arbeiten von Kühne und Chittenden, sowie Neumeister von Interesse. Wiewohl bereits Kühne und Chittenden²⁾ die Protoalbumose nach den Ergebnissen der Trypsinverdauung (Bildung bedeutender Mengen

1) Es könnte der Einwand erhoben werden, dass die Heteroalbumose kürzer (um ca. 2 Wochen) verdaut worden war, als die Protoalbumose, und vielleicht bei gleich langer Einwirkung des Fermentes die intensive Biuretreaction dort ebenfalls verschwunden wäre. Dass jedoch einer etwa 2 Wochen länger währenden Verdauung allein nicht der entscheidende Einfluss auf das völlige Schwinden der Biuretreaction zukommen dürfte, geht aus den Untersuchungen von Kutscher (Endprodukte der Trypsinverdauung. Habilitationsschrift, Strassburg 1899, S. 9 u. 21) hervor, der selbst nach beinahe 5monatlicher Autodigestion des Pankreas noch immer eine schwache Biuretreaction erhielt.

2) Zeitschr. f. Biologie, N. F. Bd. 2, 1884, S. 46.

von Tyrosin, Leucin und des bromfällbaren Körpers) als einen Repräsentanten der Hemigruppe ansahen, gelang es weder ihnen noch Neumeister¹⁾ die Entfernung des durch Trypsin so schwer angreifbaren «Antipepton»-Complexes zu erzielen, so dass letzterer sich gezwungen sah, auch der Protoalbumose Antigruppen zuzuschreiben. Das Verhalten unserer Protoalbumose bestätigt jedoch die Vermuthung dieser Autoren, dass dieser «Antipepton»-Complex auf eine Verunreinigung mit Heteroalbumose zu beziehen ist.²⁾

Was den im Gegensatz zur Heteroalbumose hier so reichlich auftretenden, durch Brom fällbaren Körper anbelangt, so zeigte Kurajeff,³⁾ dass aus einer durch kurze Trypsinverdauung von Fibrin erhaltenen Lösung bei Halbsättigung eine Fraction erhalten wird, welche schon nach zweitägiger weiterer Trypsinverdauung mit Brom eine starke Rothfärbung gibt und offenbar das Proteinochrom in reichlichen Mengen enthält. Da die Heteroalbumose nur spärliche Bromfällung gibt, so kann bloss die Protoalbumosefraction jenes Bromproteinochromogen in nennenswerther Menge geliefert haben. Von den übrigen Fractionen gab nur die Nachbarfraction (bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung) den Bromniederschlag. Endlich scheint es bemerkenswerth, dass selbst nach $2\frac{1}{2}$ monatlicher Trypsinverdauung noch der Nachweis des durch Brom fällbaren Körpers gelang.

V. Zeitliches Auftreten der Proto- und Heteroalbumose bei der Fibrinverdauung.

Versucht man die Ergebnisse der mit Pepsin und Trypsin durchgeführten Spaltungsversuche zu sichten unter Berücksichtigung der Eingangs aufgeworfenen Frage über den genetischen Zusammenhang der einzelnen, bei der Spaltung des Fibrins auftretenden Albumosen und Peptone, so erweist es sich als nöthig, zuerst über die Abstammung der beiden hier

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 5, 1887, S. 391.

2) Siehe Kühne u. Chittenden, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 1, 1883, S. 208 und Neumeister, daselbst, Bd. 5, 1887, S. 392.

3) D. Kurajeff, Zur Kenntniss der Bromproteinochrome. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd XXVI, S. 511 u. 512.

untersuchten Fractionen orientirt zu sein. Gerade das Fehlen gewisser für die meisten genuinen Eiweisskörper so charakteristischen Merkmale, so der Furfurolreactionen, bei beiden Albumosen könnte verleiten, dieselben als von der Muttersubstanz recht weit abstehende Spaltungsprodukte anzusehen, welche vielleicht selbst erst aus einer der übrigen Fractionen durch Abspaltung hervorgegangen sind. Für die Kühne'sche Proto- und Heteroalbumose hat Neumeister¹⁾ nachgewiesen, dass bei der peptischen Verdauung des Fibrins, sowie beim Kochen mit 1%iger Schwefelsäure zunächst nur Proto- und Heteroalbumose gebildet werden, während Deuteroalbumose erst später auftreten soll. Goldschmidt²⁾ konnte durch zahlreiche Versuche, die an Eiereiweiss und krystallisirtem Serumalbumin angestellt waren und die genaue zeitliche Einwirkung von Schwefelsäure und Salzsäure bei verschiedener Temperatur und Concentration zu beurtheilen gestatteten, feststellen, dass die «primären» Albumosen zwar frühzeitig auftreten, jedoch keineswegs zur Bildung aller Deuteroalbumosen nothwendig sind. Einen besseren Ueberblick dieser Verhältnisse gestatten die von E. Zunz³⁾ durchgeführten umfangreichen quantitativen Untersuchungen über die Verdauungsprodukte verschiedener Eiweisskörper, deren Resultate für die hier aufgeworfene Frage von einschneidendster Bedeutung sind und weiter unten noch erörtert werden sollen. Bezüglich der Verdauungsprodukte des Fibrins, das weder von Goldschmidt, noch von Zunz in den Bereich ihrer Untersuchungen gezogen worden war, versuchte ich in nachfolgender Weise durch Verfolgung des zeitlichen Verlaufes der Verdauung über den Zusammenhang der beiden Produkte mit dem Fibrin Aufschluss zu erlangen.

Gut gewaschenes Fibrin wurde zu etwa 20—25 g in drei Kölbchen mit etwa 250 ccm. 0,25%iger Salzsäure und Grübler'schem Pepsin in den Brutschrank bei 35—40° gebracht und die Verdauung beim ersten Kölbchen nach drei Stunden, beim zweiten nach 20 Minuten und beim dritten nach 5 Minuten unterbrochen, die einzelnen Lösungen neutralisirt, über freier Flamme in der Schale aufgekocht und von dem abgeschiedenen

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 5, 1887, S. 387.

2) a. a. O.

3) E. Zunz. Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 123.

untersuchten Fractionen gewisser für die charakteristischen Merkmalen Albumosen könnte Substanz recht welche vielleicht durch Abspaltung Proto- und Heteroalbumosen dass bei der Kochen mit 1% Heteroalbumose später auftreten Versuche, die an Schwefelsäure und Concentration die primären keineswegs sind. Einen die von E. Z. Untersuchung Eiweisskörper von einer erörtert des Filtrates in den verstreut zeitlich

Sättigung der neutralen Lösung (Deutoalbumose B)	Säurezusatz zur neutral. ges. Lösung (Deutoalbumose C)	Albumosenfreies Filtrat
starke Trübung und Abscheidung von dichten, schmierigen Flocken	klar	Biuretreaction negativ. Jodquecksilberkalium mit und ohne HCl keine Trübung, Jodjodkalium nach längerer Zeit Trübung
Trübung und flockiger Niederschlag nach Stehen	Abscheidung in reichlichen Flocken	klar oder nur geringe Opalescenz
		schwache, aber deutliche Biuretreaction. Jodquecksilberkalium erzeugt starke Trübung und Flockenbildung, Jodjodkalium dichte Trübung

Neutralisationspräcipitat, resp. noch unverdauten und coagulablen Eiweiss abfiltrirt. Die neutralen, etwas eingeeengten Lösungen wurden zur Trennung der Hetero- und Protoalbumose mit dem fünffachen Volumen 95%igen Alkohols gefällt, der schön weisse, flockige Niederschlag filtrirt, abgepresst und in Wasser gelöst; das alkoholische Filtrat wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen; sowohl die Lösung des Niederschlags, wie des Trockenrückstandes wurde mit Ammonsulfat in einzelne Fractionen zerlegt.

Tabelle XVIII.
I. Dreistündige Verdauung.

	$\frac{1}{2}$ -Sättigung (Proto- und Heteroalbumose)	$\frac{2}{3}$ -Sättigung (Deuteroalbumose A)	Sättigung der neutralen Lösung (Deuteroalbumose B)	Säurezusatz zur neutral. ges. Lösung (Deuteroalbumose C)	Albumosenfreies Filtrat
Alkoholunlöslicher Theil	reichliche Abscheidung von Heteroalbumose	dichte, sich auch nach tagelangem Stehen nicht absetzende und schlecht abzufiltrirende Trübung	reichliche flockige Abscheidung	klar	intensive Biuretreaction: Molisch's Reaction positiv. Jodjodkalium u. Jodquecksilberkalium erzeugen Fällungen
alkohollöslicher Theil	grobe, gelbgefärbte Flocken in reichlicher Menge. Dieselben abfiltrirt, abgepresst und in H_2O gelöst, gehen mit Millon's Reagens intensive Dunkelrothfärbung. Molisch's Reaction: negativ. Die trübe, wässrige Lösung klärt sich auf Alkoholzusatz (Protoalbumose)	Trübung; nach längerem Stehen Bodensatz	flockiger Niederschlag	dichte wolkige Trübung (?)	starke Biuretreaction. Molisch's Reaction sehr schwach. Jodjodkalium gibt massenhaften Niederschlag

Tabelle XIX.

II. Verdauungsdauer: 20 Minuten.

	$\frac{1}{3}$ -Sättigung (Proto- und Heteroalbumose)	$\frac{2}{3}$ -Sättigung (Deuteroalbumose A)	Sättigung der neutralen Lösung (Deuteroalbumose B)	Säurezusatz zur neutral. ges. Lösung (Deuteroalbumose C)	Albumosenfreies Filtrat
Alkoholunlöslicher Theil: derselbe lässt sich z. Th. nur schwer, selbst in heissem Wasser lösen. Die Lösungen trüben sich beim Erkalten; das ganze Verhalten entspricht den grossen im Niederschlag enthaltenen Mengen von Heteroalbumose	massenhafte Abscheidung (Heteroalbumose)	schwache Opaleszenz; erst nach 24 Stunden spärliche flockige Abscheidung	starke Trübung und Abscheidung von dichten, schmierigen Flocken	klar	Biuretreaction negativ. Jodquecksilberkalium mit und ohne HCl keine Trübung, Jodjodkalium nach längerer Zeit Trübung
Alkohollöslicher Theil: die Lösung intensiv gelb gefärbt.	Trübung und flockige Abscheidung; die Flocken auf dem Filter gesammelt geben eine trübe, wässrige Lösung, die sich bei Alkoholzusatz schön klärt (Protoalbumose)	Trübung und flockiger Niederschlag beim Stehen	Abscheidung in reichlichen Flocken	klar oder nur geringe Opalescenz	schwache, aber deutliche Biuretreaction. Jodquecksilberkalium erzeugt starke Trübung und Flockenbildung, Jodjodkalium dichte Trübung

III. Verdauungsdauer: 5 Minuten.¹⁾

	$\frac{1}{2}$ -Sättigung (Proto- und Heteroalbumose)	$\frac{2}{3}$ -Sättigung (Deuteroalbumose A)	Sättigung der neutralen Lösung (Deuteroalbumose B)	Albumosenfreies Filtrat
Alkoholunlöslicher Theil; man erhält auf Alkoholzusatz eine geringe Menge flockigen Niederschlags	Abscheidung von Flocken, reichlich im Verhältniss zur Gesamtmenge (Heteroalbumose)	auch nach 24stündigem Stehen nur sehr schwache Opalescenz	Unbedeutende Trübung der Lösung	Biuretreaction negativ Gerbsäure und Jodquecksilberkalium erzeugen keine Reaction. Jodjodkalium spärliche Abscheidung
Alkohollöslicher Theil	Ausscheidung in schönen Flocken (Protoalbumose)	schwache Opalescenz, nach 24 Stunden Flocken	Abscheidung eines flockigen Niederschlags; eine Lösung desselben gibt Biuretreaction, fällt mit Jodjodkalium und zeigt eine schönviolette Färbung mit Molisch's Reagens	Biuretreaction negativ. Jodquecksilberkalium gibt Opalescenz.

Man sieht, dass in allen 3 Versuchen sowohl die Heteroals auch die Protoalbumose erstens von allen übrigen Verdauungsprodukten am reichlichsten auftreten, zweitens, dass sie schon nach kürzester Digestionsdauer vorhanden sind, wo

¹⁾ Bereits nach dieser Zeit war ein verhältnissmässig grosser Theil des Fibrins in Lösung gegangen, ein anderer Theil gequollen, der Rest unverändert; der gelöste Theil wurde abgossen und wie oben angeführt behandelt.

die übrigen Spaltungsprodukte entweder überhaupt nicht, oder bis auf die Albumose B, in unerheblicher Menge nachweisbar sind. Von den schwer fällbaren Produkten kommt nur die bei voller Sättigung ausfällbare Fraction (Deuteroalbumose B) in Betracht, deren Bildung schon frühzeitig in ausgiebigem Maasse stattfindet und, wie Goldschmidt schon fand, des öfteren vor dem Auftreten der «primären» Albumosen nachweisbar ist. Man wird durch diese Thatsachen zu dem Schluss gedrängt, dass auch Proto-, Hetero- und Deuteroalbumose B des Fibrins unabhängig von einander als primäre Produkte entstehen.

Was die übrigen Ergebnisse dieser Versuche anbelangt, so möchte ich nur in Kürze darauf hinweisen, dass durch den auffallend raschen Zerfall des Fibrins unter der Einwirkung von Pepsin und Säure verhältnissmässig bald die Bildung beinahe aller Albumosenfractionen, besonders aber auch der Peptone eintrat. Abgesehen von diesem raschen zeitlichen Ablauf der Verdauung zeigte die Reihenfolge des Auftretens der einzelnen Produkte eine volle Uebereinstimmung mit den Befunden von Zunz. Während die der Albumose B entsprechende Fraction schon bei Beginn der Verdauung gleichzeitig mit den «primären» Albumosen in erheblicher Stärke auftrat, war die bei $\frac{2}{3}$ -Sättigung ausgefällte Fraction (Albumose A) erst zwischen halb- und dreistündiger Verdauungsdauer in Flocken abzuschcheiden; dabei ist hervorzuheben, dass der alkohollösliche Theil dieser Fraction stets der ansehnlichere war, der durch 80%igen Alkohol gefällte dagegen recht spärlich ausfiel. Da Grund zur Annahme besteht, dass die alkohollösliche und die alkoholunlösliche Fraction zwei verschiedene Produkte darstellen, so verdient dies Verhalten besondere Beachtung. Die Albumose C trat hier relativ früh auf; doch fiel ihr Auftreten, ebenso wie bei Goldschmidt und Zunz, beinahe vollkommen mit der Entstehung der Peptone zusammen. Auch bei den letzteren schien sich die grössere Menge dieser Produkte in dem alkohollöslichen Theil zu finden, wie schon das frühere Auftreten der Biuretreaction dieses Theiles beweist. Endlich sei noch bemerkt, dass Jodjodkalium und Jodquecksilberkalium

in saurer Lösung im Stande waren, Trübungen zu erzeugen, wo der Mangel der Biuretreaction das Vorhandensein von Peptonen ausschloss.

VI. Stellung der Proto- und Heteroalbumose zum Fibrin und zu den übrigen Verdauungsprodukten desselben.

Wie Eingangs erwähnt, sah die Kühne'sche Schule das Auftreten der Proto- und Heteroalbumose als ein Durchgangsstadium an, das nothwendig der Bildung der übrigen peptischen Produkte vorangehen muss. Diese Auffassung stützte sich auf die oben erwähnten Versuche Neumeister's und fand in dem von ihm entworfenen Schema der Pepsinverdauung¹, seinen Ausdruck. Diese bis in die neueste Zeit allgemein festgehaltene Vorstellung kann jetzt nicht mehr aufrecht erhalten werden. Dies ergibt sich zum Theil unmittelbar aus den gefundenen Thatsachen. Es scheint mir daher nützlich, die hierher gehörigen Befunde kurz nebeneinander zu stellen.

1. Sowohl die Hetero- als auch die Protoalbumose des Fibrins zeigen einen höheren C- und N-, einen niedrigeren O-Gehalt als das Fibrin selbst:

Fibrin nach Hammarsten	Heteroalbumose	Protoalbumose
C 52,68	55,12	55,64
H 6,83	6,61	6,80
N 16,91	17,98	17,66
S 1,10	1,22	1,21
O 22,48	19,07	18,69

Beide Albumosen sind im Gegensatz zur Muttersubstanz kohlenhydratfrei, beide enthalten nur leicht abspaltbaren Schwefel.

2. Die Hetero- und Protoalbumose weichen aber voneinander nicht bloss in Löslichkeitsverhältnissen und reactionellem Verhalten ab, sondern zeigen einen wesentlich verschiedenen Bau:

¹) Vgl. Neumeister, Lehrbuch der physiologischen Chemie II. Aufl. S. 231; Jena 1897.

Heteroalbumose

enthält an 39 % das Gesamtstickstoffs in basischer Form;

enthält die aromatische Gruppe nur zum kleinsten Theil in einer Form, die bei der Spaltung zu Tyrosin- oder Indolbildung führt;

liefert sehr reichlich Leucin und erhebliche Mengen Glycocol.

Protoalbumose

gibt bloss 25 % basischen Stickstoff;

liefert sehr reichlich Tyrosin, resp. Indol und Skatol;

gibt nur wenig Leucin und kein Glycocol.

3. Hetero- und Protoalbumose entstehen aus Fibrin nebeneinander, aber nicht auseinander.

4. Beide geben jedoch bei der weiteren peptischen oder tryptischen Spaltung Produkte von dem Verhalten der Deuteroalbumosen A und B und des Peptons B.

Knüpfen wir an den letztangeführten Befund an, so scheint darin die Richtigkeit der Neumeister'schen Auffassung eine Stütze zu finden. Dem steht jedoch die Thatsache entgegen, dass die Proto- und Heteroalbumose kohlenhydratfrei sind, während ich in meinen früheren Versuchen die Deuteroalbumosen des Fibrins kohlenhydrathaltig gefunden habe. Um irrigen Deutungen dieser Sachlage von vornherein vorzubeugen, halte ich es für zweckentsprechend, einer für die nächste Zeit in Aussicht genommenen weiteren Mittheilung über die peptischen Verdauungsprodukte vorzugreifen und aus dem mir vorliegenden Beobachtungsmaterial das hierher gehörige vorläufig mitzutheilen.

Bei planmässiger, nicht eingreifender Reinigung der Deuteroalbumosen des Witte-Peptons ist es mir gelungen, die als Deuteroalbumose A und C bezeichneten Körper völlig von den die Kohlenhydratreaction veranlassenden Beimengungen zu befreien. Hingegen ergab sich bei fortschreitender Reinigung immer deutlicher ein hoher Kohlenhydratgehalt der Deuteroalbumose B und des davon abstammenden Peptons A, der denn auch bei der Spaltung in reichlicher Bildung von reducirender und osazonbildender Substanz zum Ausdruck gelangte.

Hieraus folgt ohne Weiteres: 1. Die Proto- und Heteroalbumose können als kohlenhydratfreie Stoffe nicht die Mutter-

substanz der kohlenhydrathaltigen Albumose B resp. des Peptons A sein.

2. Es muss neben ihnen weitere primäre Produkte der Eiweiss-spaltung geben, zum mindesten eines, das die Kohlenhydratgruppe enthält — beim Fibrin somit die Deuteroalbumose B.

3. Wenn, wie oben erwähnt, sowohl die Proto- als auch Heteroalbumose bei weiterer Verdauung ein Produkt vom Charakter der Deuteroalbumose B liefern (B_p und B_h), können diese mit der direkt aus Witte-Pepton erhältlichen kohlenhydratreichen Deuteroalbumose B nicht identisch sein. In der That geben die aus Proto- und Heteroalbumose erhaltenen B-Albumosen keine Spur von Kohlenhydratreaction. Diese Albumosen B_p und B_h sind somit sicher secundäre Produkte. Die Existenz von zwei oder mehr Albumosen B, einer kohlenhydratreichen und einer oder mehrerer kohlenhydratfreien, habe ich übrigens noch auf anderem Wege darthun können. Wurde nämlich die kohlenhydratreiche B-Albumose des Witte-Peptons anhaltender (6wöchentlicher) Pepsinverdauung überlassen, so ging der kohlenhydrathaltige Antheil in Pepton A über, und es blieb reichlich ein Körper zurück, der sich wie die ursprüngliche Substanz erst bei Sättigung der neutralen Lösung mit Ammonsulfat ausschied, auch schöne Biuretreaction, aber keine Kohlenhydratreaction mehr gab.

Diese Schlussfolgerungen stehen in trefflicher Uebereinstimmung mit den Beobachtungen von E. Zunz. Ausgehend von der quantitativen Verfolgung des peptischen Spaltungsvorgangs gelangte er zu dem Schluss, dass mindestens drei Produkte -- (Proto-, Heteroalbumose und Deuteroalbumose B) primär entstehen, und dass die secundäre Albumose B, welche bei ihrer Bildung zwei Maxima erkennen lässt, keine einheitliche Substanz sein dürfte. Es ist überflüssig hervorzuheben, dass diese Uebereinstimmung den uns gemeinsamen Erfahrungen erhöhtes Gewicht verleiht. Ich möchte darauf hinweisen, dass Zunz an anderem Material, nemlich Serum- und Eieralbumin, Serunglobulin und mit ganz anderen Methoden gearbeitet hat, als ich.

Ich habe im Vorstehenden von meinen Erfahrungen über die Deuteroalbumosen des Fibrins und seiner Peptone nur soweit Gebrauch gemacht, als zur Deutung der an Proto- und Heteroalbumose gemachten Beobachtungen nöthig war. Ich gedenke über diesen zweiten Theil meiner Untersuchungen demnächst ausführlich und zusammenhängend zu berichten. Dann wird sich auch für physiologische Schlussfolgerungen ausreichender Raum finden. Ich will darum auf diese Seite der Frage jetzt nicht eingehen und nur bemerken, dass für die experimentelle weitere Verfolgung derselben, speciell auch im Hinblick auf die Bedeutung der einzelnen reinen Verdauungsprodukte für den Stoffwechsel, im hiesigen Institut Sorge getragen ist.

Strassburg, Mai 1899.

Ueber die Jodzahl der Eiweisskörper.

Von

F. Blum, Frankfurt a. M.

(Der Redaction zugegangen am 15. Juli 1899.)

« Lässt man Jod, Brom oder Chlor auf feuchtes Eiweiss einwirken, so entzieht der grössere Theil des Halogens dem Eiweissmolekül Wasserstoff und verbindet sich mit diesem zu Jod-, Brom- oder Chlorwasserstoff ($HJ - HBr - HCl$); diese Säuren hinwiederum lagern sich so lange dem Eiweiss an, bis dessen Säurebindungsvermögen erschöpft ist; der hiernach verbleibende Ueberschuss gibt alle Reactionen der freien Mineralsäuren (Congoreaction, Phloroglucin-Vanillinreaction etc.).

Ein bestimmter Antheil der Halogene aber tritt in eine andersartige Verbindung mit dem Eiweissmolekül, wobei Produkte entstehen, die als mehr oder weniger fest vereinigte Halogeneiweissderivate anzusehen sind. »

Mit vorstehenden Sätzen habe ich im Jahre 1896¹⁾ zuerst über meine Erfahrungen bei der Halogenirung von Albumosen, Pepton und Protogen (Methyleneiweiss) berichtet.

Im folgenden Jahre habe ich dann auf dem 15. Congress²⁾ für innere Medicin weiterhin ausgeführt:

« Es dürfte auch in physiologisch-chemischer Richtung von erheblichem Interesse sein, dass nicht nur in diesen oder

1) Ueber Halogeneiweissderivate und ihr physiologisches Verhalten. Münch. Med. Woch. 1896. Nr. 45.

2) Ueber synthetisch dargestellte Specifica. Verhandlungen des 15. Congresses für innere Medicin. 1897 (nicht 16. Congress etc. 1898, wie Oswald irrthümlich citirt).

jenen Eiweisskörpern sich Halogen in das Molekül einfügen lässt, sondern dass nach meinen Untersuchungen sehr viele, vielleicht erweist es sich späterhin alle Eiweisskörper Gruppen in sich enthalten, die für die Halogene substituitionsfähig sind.»

Wenn auch Mulder schon im Jahre 1843 und Löw 1885¹⁾ die Beobachtung gemacht hatten, dass beim Eialbumin eine kleine Menge von Chlor resp. Brom in eine festere Verbindung einzutreten vermag, so waren doch meine beiden obigen Mittheilungen die ersten, die die Fähigkeit der Eiweisskörper, Halogen in ihr Molekül aufzunehmen, als eine weit verbreitete und regelmässig verlaufende Eiweissreaction erkannt und ausgesprochen haben.

Es sind dann in rascher Folge eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht worden, die das von mir Gefundene bestätigt und im Einzelnen weiter ausgebaut haben. Speciell haben die Arbeiten von Hofmeister und seinen Schülern dadurch einen Fortschritt gezeitigt, dass sie möglichst reine, krystallisirte Eiweisskörper der Jodirung unterworfen haben.²⁾

Ich selbst habe in Gemeinschaft mit Herrn Dr. W. Vaubel in meinem Laboratorium die Frage weiter verfolgt, wie unter möglichst geringer Veränderung des Eiweissmoleküls die Substitution mit Halogen gleichzeitig zu einer maximalen gemacht werden könnte. Das Resultat unserer Untersuchung haben wir in unserer zweiten gemeinschaftlichen Veröffentlichung³⁾ in These 3 und 4 zusammengefasst:

« 3. Durch Beseitigung des jeweils bei der Halogenirung entstehenden Halogenwasserstoffs wird das Eiweissmolekül für weitere Halogensubstitution zugänglich gemacht.

4. Bei dieser Halogenirung in dauernd neutraler Lösung

1) Bezüglich der einschlägigen Litteratur verweise ich auf Blum, und Vaubel, Ueber Halogeneiweissderivate. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 57, 1898, S. 365.

2) Siehe hierzu ausser der Veröffentlichung von Hofmeister diejenige von D. Kurajeff, Ueber Einführung von Jod in das krystallisirte Serum- und Eialbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXVI, Heft 5 u. 6.

3) l. c.

gelangt man zuletzt zu Halogeneiweisssubstanzen mit constantem Gehalt an intramolekular gebundenem Halogen und damit zu Vergleichszahlen für die molekulare Grösse der einzelnen Eiweisskörper, sowie ihrer Derivate. »

Auf Grund dieser Erfahrungen haben wir speciell für die Jodirung eine Methode ausgearbeitet, die durch die Leichtigkeit ihrer Ausführung und durch die Möglichkeit, den eine maximale Substitution verhindernden und Spaltungen am Eiweissmolekül hervorrufenden Halogenwasserstoff sofort bei seiner Entstehung zu neutralisiren, sich ganz besonders zur Erprobung des Verhaltens einer Eiweisssubstanz bei der Jodirung und zur Bestimmung ihres Jodsättigungswerthes und ihrer Jodzahl eignet:

Methode.

Der zu prüfende Eiweisskörper wird in einer mit Natrium bicarbonicum versetzten wässrigen Lösung oder Suspension unter sorgsamer Beibehaltung der alkalischen Reaction bei 40—50° C. so lange durch Zusatz von Jodjodkalilösung jodirt, bis dauernd ¹⁾ Jod frei geblieben ist. Nunmehr wird die Mischung abgekühlt, eventuell filtrirt, mit Natronlauge im Ueberschuss versetzt und hierauf sofort mit Essigsäure angesäuert. Ist der jodirte Eiweisskörper dadurch noch nicht zur Ausfällung gekommen, so wird er durch Alkohol oder Aceton niedergeschlagen.

Die Reinigung der Jodeiweisskörper von Jod, Jodnatrium und jodsaurem Natrium geschieht nach der Filtration am besten im Anschluss an eine nochmalige Aufnahme in verdünnter Lauge und Herausfällung mit Essigsäure durch Auskochen mit Wasser und mit Alkohol, bis letzterer kein Jodnatrium mehr aufnimmt.

Nunmehr wird das Präparat bis zur Constanz getrocknet und der Analysirung mittelst der Methode von Ca-

¹⁾ Circa $\frac{1}{2}$ Stunde unter Umschütteln.

rius, der Natron-Salpeterschmelze und Jodbestimmung nach Volhard¹⁾ oder nach Fresenius²⁾ unterworfen.

Die Methode, die ich im Folgenden der Kürze halber die Blum-Vaubel'sche nennen werde, gründet sich auf folgende Beobachtungen:

Lässt man Jod in Form von Jodjodkalilösung oder alkoholischer Jodtinctur z. B. auf Eiereiweiss einwirken, so erhält man nach Beseitigung des überschüssigen Jods und des Jodwasserstoffs nach dem obigen Reinigungsverfahren ein Präparat, das in maximo ca. 4% Jod enthält.³⁾ Eine neuerliche Jodirung eines solchen niedrig substituirten Jodeiweisses liefert ein höherwerthiges Produkt, bis nach etwa 6 maliger Wiederholung der Neutralisation des Jodwasserstoffs und nachfolgender Jodirung der Jodgehalt constant bei 6—7% verharret.

Um dies mühsame und verlustbringende Verfahren abzukürzen, haben wir den Zusatz von Natrium bicarbonicum bei der Jodirung gewählt. Dies Salz wirkt den meisten Eiweisskörpern gegenüber als Alkali und hält sie dadurch in Lösung: mit Jod aber setzt es sich nur in ganz geringem Maasse um, so dass dasselbe ungehindert auf das Eiweissmolekül einwirken kann. Der hierbei entstehende und, wie gezeigt, die maximale Substitution verhindernde Jodwasserstoff tritt nun mit dem Natrium bicarbonicum zum bei Weitem grösseren Theile sofort in Reaction und wird dadurch unschädlich gemacht. In Folge dessen vollzieht sich der Jodirungsvorgang rasch und ungehindert, und ist zumeist schon innerhalb von weniger als einer Stunde vollendet.

Zu beachten ist nur, dass die Temperatur die angegebenen

1) Unter der Voraussetzung, dass kein Chlor dem Jodeiweiss mehr anhaftet, ist die Silber-Rhodantitirung in der angesäuerten Lösung der Schmelze brauchbar, wenn man zur Beseitigung der reichlich entstehenden salpetrigen Säure vor dem Rhodanzusatz Harnstoff zugegeben hat.

2) Vergl. bezüglich dieser von mir vielfach erprobten, auch zur Jodbestimmung in der Schmelze geeigneten massanalytischen Methode: Fresenius, Anleitung zur quantitativen Analyse, 6. Auflage, 1. Bd., S. 482.

3) Der höchste erreichte Jodgehalt war 4,1% bei einer 7tägigen Einwirkung von Jod und Jodwasserstoff auf Eiereiweiss bei 40—50° C.

Grenzen nicht wesentlich überschreitet, da bei 60—70° C. sich das Bicarbonat in Soda umsetzt, das seinerseits Jod energisch bindet und auch für das Eiweissmolekül nicht indifferent ist.

Der Zusatz von Natronlauge zu dem abgekühlten Jodirungsgemisch ist nothwendig, um das freie Jod in Jodalkali und jodsaures Alkali überzuführen, und auch deshalb, weil ein Theil des bei der Halogenirung entstandenen Jodwasserstoffs sich trotz Gegenwart von Bicarbonat an das Eiweissmolekül anlagert. Es verhält sich hier also das Eiweiss der Säure gegenüber als die stärkere Base.

Um jegliche Spaltung durch die Lauge zu vermeiden, muss sofort nach der Laugeneinwirkung Essigsäure zugesetzt werden; es ist deshalb eine Filtration, wofern sie erforderlich sein sollte, noch vor dem Zusatz der Lauge vorzunehmen.

Die jetzt folgenden Procedures sind alle auf die vollständige Entfernung des nicht intramolekular gebundenen Jods gerichtet; so das Abfiltriren, das nochmalige Aufnehmen in Lauge und Fällern mit Essigsäure und vor Allem das Auskochen mit Wasser und Alkohol. Ein einfaches Waschen des Niederschlages genügt nicht; denn die durch Essigsäure gefällten Jodeiweisskörper halten lebhaft in einer Art von Doppelverbindung bestimmte Mengen von Jodalkali in sich zurück, die erst, nachdem die Eiweisssubstanzen in einen Coagulationszustand übergeführt sind, richtig extrahirt werden können.

Der Methode haftet wohl als einziger Mangel der Nachtheil an, dass schon durch Natrium bicarbonicum und kurze Laugeneinwirkung allein, auch ohne Gegenwart von Jod, der locker gebundene Schwefel abgespalten wird.

So ergab z. B. Eiereiweiss bei der Einwirkung von Natrium bicarbonicum (bei 40° C.) und späterhin Lauge einen Schwefelgehalt von 0,6%: ein Theil desselben Präparats, der noch ausserdem mit Jod versetzt war, lieferte ein Jodeiereiweiss mit 0,5% Schwefel.

Es ist also nicht von der Hand zu weisen, dass die Schwefelverminderung bei unserer Methode mehr durch die zugesetzten basischen Reagentien, als auf die Jodirung zurückzuführen ist.

Diese kleine Fehlerquelle kommt aber gegenüber den grossen Vorzügen der Methode kaum in Betracht und dürfte für die Bestimmung der relativen molekularen Grösse des Eiweissmoleküls aus seiner Jodzahl vollständig belanglos sein.

Halogenirt man in saurer Lösung, so ist nach unseren Versuchen einerseits eine maximale Halogenaufnahme in das Eiweissmolekül nicht erreichbar und andererseits sind dabei tiefgreifende, von dem eigentlichen Halogenierungsprocess unabhängige und nur durch die Säuren bedingte Spaltungen keineswegs mit Sicherheit auszuschliessen.

Ist aber mit der Halogenirung zusammen eine Säurespaltung am Eiweissmolekül eingetreten, dann kommt man zu Jodzahlen, die denjenigen der ungespaltenen Substanzen nicht entsprechen, sondern oft wesentlich oberhalb dieser Jodwerthe liegen. Dass diese hohen Jodzahlen trotzdem nur unvollkommen mit Jod gesättigten Präparaten angehören, lässt sich daraus erkennen, dass es gelingt, mittelst der Blum-Vaubel'schen Methode noch weiteres Jod einzuführen. Auch die nachträgliche Spaltung der Halogeneiweisskörper mittelst Erhitzen mit verdünnten Säuren oder Alkalien liefert einen Anhalt für die Beurtheilung ihrer Halogensättigung. Zerlegt man nämlich die halogenirten Substanzen, dann gelangt man zu einem Punkte, bei dem die Spaltung Halt zu machen scheint: ein offenbar besonders widerstandsfähiger Antheil des Moleküls, der zugleich der hauptsächliche Halogenträger ist, leistet seiner Aufschliessung einen erheblichen Widerstand. Dieser stickstoffhaltige, schwefelfreie Eiweisskern,¹⁾ der wohl in Folge einer Verseifung stark saure Eigenschaften besitzt, enthält z. B. beim Eiereiweiss mehr wie das Doppelte der Jodmenge des ungespaltenen Ausgangs-

1) Die Resistenz gegen die Spaltung ist natürlich keine absolute: allmählich, nachdem schon lange aller Schwefel abgeschieden ist, beginnt eine ganz langsame Halogenentziehung, mit der gleichzeitig eine raschere Aufspaltung des widerstandsfähigen Eiweissantheils vor sich geht. Dabei bilden sich in Lauge unlösliche, halogenreichere Produkte (17—20% Jod). Wahrscheinlich werden neben anderen Zersetzungen auch Carboxylgruppen von dem Eiweisskern dabei abgetrennt.

materials. Hat man z. B. ein nach der Blum-Vaubel'schen Methode gesättigtes Jodeiweiß (mit 6—7% Jod) gespalten, dann findet man in dem Spaltungsprodukt 14—15% Jod; war aber das Jodeiweiß zwar ungespalten, aber nicht vollkommen gesättigt, hatte es etwa nur einmal — wenn auch tagelang — unter der Einwirkung von Jod gestanden, so dass es nicht mehr als 3—4% Jod enthielt, dann wies jener halogenhaltige Eiweisskern nur ca. 8% Jod auf. Waren bei der Jodirung gleichzeitig Spaltungen vor sich gegangen, ohne dass trotz des scheinbar hohen Jodgehalts von z. B. 8% eine vollkommene Sättigung mit dem Halogen eingetreten wäre, dann lieferte die weitere energische Zerlegung ein Produkt mit nur 12% Jod.

Besonders instructiv liess sich der Nachweis der unvollkommenen Sättigung mit Halogen bei Brom- und Chloreiweisskörpern gestalten, indem es hier bei ungesättigten Präparaten gelang, das an dem Halogensättigungswerthe Fehlende mittelst der Blum-Vaubel'schen Methode in Form von Jod neben dem Brom oder Chlor in das Eiweissmolekül einzuführen.

Auf Grund aller dieser Erfahrungen schlage ich deshalb vor, als «Jodzahl der Eiweisskörper» den mittelst der Blum-Vaubel'schen Methode erreichbaren intramolekularen Jodgehalt zu bezeichnen.

Diese «Jodzahl» ist durchaus dazu angethan, einen wesentlichen Factor in der Beurtheilung der Natur eines Eiweisskörpers abzugeben. Sie wird manche nach den bisherigen Merkmalen als zusammengehörig angesehene Proteide von einander trennen und andere näher zusammenführen und wird in Gemeinschaft mit den sonstigen Eigenschaften (Farbreactionen, Verhalten gegen Fällungsmittel etc.) eine neue, exactere Classification möglich machen.

Dem Beispiele Hofmeister's folgend, habe ich seit einiger Zeit zwar nicht krystallisirte, aber doch möglichst einheitliche Eiweisskörper in den Kreis meiner Untersuchung gezogen und gebe im Folgenden die an denselben gemachten Beobachtungen wieder.

Serumglobulin,

dargestellt aus Ochsenblutserum durch Halbsättigung mit Ammonsulfat, Lösen des Niederschlags und neuerliche Fällung in gleicher Weise, bis das Filtrat mit Essigsäure keine Trübung gibt.

Jodzahl: 8,45

J = 8,45 % (0,393 g liefern bei der Cariusbestimmung 0,0615 g Ag J)

S = 0,66 % (0,0185 g Ba SO₄)

N = 14,40 % (Kjeldahl mit 1,006 g)

Asche = 0,5 % (mit 0,807 g).¹⁾

Daraus berechnet sich für dies Serumglobulin (Ochsenblut) als halogen- und aschefrei ein Stickstoffgehalt von 15,82 %.

Serumalbumin,

dargestellt aus dem vom Globulin befreiten Ochsenblutserumfiltrat mittelst Fällung a) durch Essigsäure, b) durch weitere Sättigung mit Ammonsulfat (2 : 1).

ad a) Jodzahl: 11,02.

J = 11,02 % (0,3775 g liefern nach Carius 0,077 g Ag J)

S = 1,58 (0,0425 g Ba SO₄)

N = 14,45 % (Kjeldahl mit 0,906 g)

Asche = 0,22 % (0,468 g).

Daraus berechnet sich für dies Serumalbumin als halogen- und aschefrei ein Stickstoffgehalt von 16,18 %.

ad b) Jodzahl: 9,93.

J = 9,93 % (0,491 g ergeben nach Carius 0,0903 g Ag J)

S = 1,39 % (0,049 g Ba SO₄)

N = 14,68 % (Kjeldahl mit 0,796 g)

Asche = 0,22 % (mit 0,682 g).

Auf «halogen-» und «aschefrei» umgerechnet ergibt sich ein Stickstoffgehalt von 16,33 %.

Serumglobulin,

dargestellt aus dem klaren Serum eines punctirten pleuritischen Exsudats durch Halbsättigung mit Ammonsulfat. Reinigung wie oben. Fällt aus bei der Jodirung nach B.—V.

1) Behufs Aschebestimmung wurden alle Präparate mit Salpetersäure im Tiegel verbrannt. Die derart gewonnene Asche ist jodfrei.

Jodzahl: 8,99.

J = 8,99 % (0,2305 g liefern nach Carius 0,038 g Ag J)

S = 0,43 % (0,007 g Ba SO₄)

Asche = 0,48 % (mit 0,207 g).

Serumalbumin,

dargestellt aus dem vom Globulin befreiten Filtrat des pleuritischen Exsudats durch Sättigung mit Ammonsulfat.

Jodzahl: 10,5.

J = 10,5 % (0,252 g liefern nach Carius 0,049 g Ag J)

S = 1,11 % (0,020 g Ba SO₄)

Asche = 0,44 % (mit 0,3395 g).

Muskelalbumin,

dargestellt aus dem wässerigen filtrirten Muskelextract. Bei Halbsättigung mit Ammonsulfat fällt fast nichts aus; von der Trübung wird abfiltrirt und dem Filtrat so lange concentrirte Ammonsulfatlösung zugesetzt (2 : 1) bis Flocken ausfallen.

Jodzahl = 10,37.

J = 10,37 % (0,348 g liefern nach Carius 0,065 g Ag J)

N = 15,5 % (Kjeldahl mit 0,736 g)

Asche = 0,86 %.

Daraus berechnet sich für halogen- und aschefrei ein Stickstoffgehalt von 17,46 %.

Thyreotoxalbumin,

dargestellt nach Notkin-Oswald aus dem wässerigen Extract von Hammelsschilddrüsen mittelst Halbsättigung mit Ammonsulfat und öfteres Umlösen und Fällen (das Thyreoglobulin Oswald's).

Ausgangsmaterial: J = 1,05 %; N = 15,74 %; Asche = 0,2 %.¹⁾

¹⁾ Das Ausgangsmaterial wurde behufs Analysirung stets in der Weise gereinigt, dass nach mehrfachem Umlösen und Fällen zuletzt eine wässerige Lösung hergestellt und diese nach Filtration unter Erwärmen mit Essigsäure coagulirt wurde. Der Niederschlag wurde dann so lange mit Wasser ausgekocht, bis kein Ammonsulfat (Prüfung mit Ba Cl₂) mehr übergeng. Hierauf wurde getrocknet.

Jodzahl: 6.

J = 6 % (0,361 g liefern nach Carius 0,040 g Ag J)
S = 1,05 % (0,026 g Ba SO₄)
N = 14,58 % (Kjeldahl)
Asche = 0,3 %.

Aus dem Ausgangsmaterial berechnet sich für das halogen- und aschefreie Thyreotoxalbumin ein Stickstoffgehalt von 15,94 %.

Aus der mit Jod gesättigten Substanz berechnet sich für halogen- und aschefrei ein Stickstoffgehalt von 15,56 %.

Thyreotoxalbumin,

dargestellt aus Hammelsschilddrüsenextract, wie das vorige Präparat.

Ausgangsmaterial: 1,03 % J; S = 1,5 %
N = 15,8 %; Asche = 0,6 %

Jodzahl: 6,6

J = 6,6 % (0,340 g liefern nach Carius 0,0425 g Ag J)
S = 1,3 % (0,032 g BaSO₄)
N = 14,79 % (Kjeldahl)
Asche = 0,3 %

Aus dem Ausgangsmaterial berechnet sich für das halogen- und aschefreie Thyreotoxalbumin ein Stickstoffgehalt von 16,06 %.

Aus dem jodirten Präparat berechnet sich für halogen- und aschefrei ein Stickstoffgehalt von 15,89 %.

Thyreotoxalbumin,

dargestellt aus Schweineschilddrüsenextract, wie die vorigen Präparate.

Ausgangsmaterial: J = 0,44 %
Asche = 0,08 %

Jodzahl: 5,85

J = 5,85 % (0,425 g liefern nach Carius 0,046 g Ag J)
S = 1,05 % (0,0325 g BaSO₄)

Ovoalbumin,

dargestellt aus dem Eiweiss mehrerer Eier nach Entfernung des Globulins durch Verdünnung mit Wasser und Halbsättigung mit Ammonsulfat. Im Filtrat entsteht durch Essigsäure oder durch weitere Sättigung mit Ammonsulfat ein Niederschlag, der zur Jodirung verwendet wird.

Der mit Essigsäure entstandene Niederschlag enthielt nach Reinigung etc. 14,9% N.¹⁾

Jodzahl: 7,1.

J = 7,1 % (1,042 g mit Aetznatron und Salpeter geschmolzen liefern Jod entsprechend 5,8 ccm. $\frac{n}{100}$ Thiosulfat nach Fresenius)

N = 13,63% (Kjeldahl mit 0,806 g)

Asche = 1,07% (mit 0,560 g)

Auf halogen- und aschefrei umgerechnet ergibt sich ein Stickstoffgehalt von 14,85%.

Die Jodzahl des Serumglobulins liegt also bei Thier und Mensch bei 8,5—9; diejenige des Serumalbumins bei 10—11: das spezifische Schilddrüsen-eiweiss hingegen weist nur eine Jodzahl von ca. 6 auf. Dem aus dem Muskelplasma gewonnenen Albumin kommt eine dem Serumalbumin entsprechende Jodzahl zu; der Stickstoffgehalt scheint aber dafür zu sprechen, dass hier doch keine identische Verbindungen vorliegen.

Dem Ovoalbumin gehört eine Jodzahl von nur 7 an — ein Werth, der anzeigt, dass die bisher zur gleichen Eiweissgruppe gerechneten Albumine des Eiereiweisses und des Blutserums recht erhebliche Verschiedenheiten in ihrer molekularen Structur besitzen müssen.

Die Jodzahlen des Nucleins und des Caseins liegen derjenigen des Ovoalbumins ziemlich nahe; das erstere,²⁾ ein aus Hefe hergestelltes, von Merck bezogenes Präparat, nahm 6,9% Jod auf;³⁾ das Casein ist mit 7—7,5% als gesättigt anzusehen. In ein von Merck geliefertes schön weisses Nucleohiston konnten 11,22% Jod eingeführt werden. Das Nucleoproteid der Schweineschilddrüse (Oswald)⁴⁾ nahm einmal 12,5. ein anderes Mal 12,45% Jod auf.

1) Hofmeister setzt sein krystallisirtes Eialbumin mit 15% N in Rechnung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIV, S. 169.

2) Vgl. hierzu Blum und Vaubel, l. c., S. 376.

3) Der Phosphorgehalt erniedrigte sich dabei auf 0,3 %.

4) Oswald, «Die Eiweisskörper der Schilddrüse», Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVII, Heft 1 und 2.

Auf die Arbeit von Oswald werde ich an anderer Stelle ausführ-

Aber nicht nur zur Charakterisirung von ungespaltenen Eiweisskörpern vermag die Jodzahl zu dienen; sie ist auch im Stande, den Ablauf eines Umwandlungsprocesses in seinen einzelnen Phasen widerzuspiegeln: überlässt man z. B. Eiweiss der künstlichen Verdauung und prüft zu bestimmten Zeiten die einzelnen Verdauungsprodukte auf ihre Jodaufnahmefähigkeit mittelst der Blum-Vaubel'schen Methode, dann bekommt man aus dem Vergleich der einzelnen Jodzahlen unter sich und mit denjenigen des Ausgangsmaterials ein klares Bild der mit der fortschreitenden Verdauung sich abspielenden Verkleinerung des Eiweissmoleküls. Auch dann, wenn man, anstatt die einzelnen Verdauungsprodukte zu isoliren und nachträglich zu jodiren, von einem gesättigten Jodeiweisskörper ausgeht und diesen der Verdauung überlässt, ergeben die Jodzahlen in den einzelnen Stadien Aufschluss über den Fortgang der Spaltung. So wurde z. B. Jodcasein, dessen Jodgehalt in völlig trockenem Zustand 6,8% betrug, der Salzsäurepepsinverdauung bei 40° C. überlassen. Das Acidalbumin, dargestellt durch Fällung mit Glaubersalzlösung in der Wärme, enthielt nach 20 Stunden über 8% Jod und nach 3×24 Stunden 12,8%. Solchen bisher noch nicht nachweisbaren Umwandlungen wird man in Zukunft durch Feststellung der Jodzahl nachgehen können.

Es wird auch von Interesse sein, bei Albuminurie, bei entzündlichen und bei Stauungsergüssen die Jodzahl der in den Flüssigkeiten enthaltenen Eiweisskörper zu eruiren. Man wird dadurch mancherlei neuen Aufschluss gewinnen können.¹⁾

lich eingehen; die «Zur Abwehr» betitelten Angriffe des Herrn Dr. E. Roos zu Freiburg i. B. (diese Zeitschrift, Bd. XXVI, Heft 5) beantworte ich nicht, weil dieselben der thatsächlichen Basis entbehren und nur persönlicher Natur sind.

¹⁾ Es erübrigt mir noch, meinem Assistenten, Herrn Dr. Armin Fischer, meinen Dank für seine werththätige Mithülfe bei der Ausführung der vorstehenden Untersuchungen auch öffentlich auszusprechen.

Ueber die Zusammensetzung des Knorpels vom Haifisch.

Von

G. von Bunge.

(Der Redaction zugegangen am 18. Juli 1899.)

Im Jahre 1873 machten P. Petersen und F. Soxhlet¹⁾ die auffallende Mittheilung, der Knorpel des im nördlichen Eismeer lebenden Haifisches *Scymnus borealis* bestehe zu 16,69% des frischen Gewebes und zu 64,96% der Trockensubstanz aus Kochsalz. Es musste unglaublich erscheinen, dass ein so festes, elastisches Gewebe der Hauptmasse nach aus einem löslichen Salze bestehe. Die Frage interessirte mich umsomehr, als ich mit eingehenden Studien über das Verhalten des Kochsalzes in den Geweben des Thierkörpers mich beschäftigte. Ich wünschte; durch eigene Analysen von der Richtigkeit dieser Angabe mich zu überzeugen. Vielfache Bemühungen, mir das Material zu verschaffen, blieben erfolglos. Erst im letzten Frühjahr bot sich mir die unerwartete Gelegenheit. Ein an der Küste von Norwegen gefangenes, 1½ Meter langes Exemplar war in Eis verpackt über Hamburg nach Basel gelangt. Das Fleisch war so frisch, dass es genossen wurde. Herr Prof. Rud. Burckhardt, der in den Besitz des Exemplares gelangt war, hatte die Güte, mir den Schultergürtel zur Analyse zu überlassen. Das Resultat derselben war folgendes:

¹⁾ Petersen und Soxhlet, Journ. f. prakt. Chem., N. F., Bd. 7. S. 181. 1873.

100 Gewichtstheile des frischen Knorpelgewebes enthielten:

Wasser	92,779
Trockensubstanz	7,221
Organische Stoffe	5,916
Anorganische Stoffe	1,305
K ₂ O	0,1540
Na ₂ O	0,6590
CaO	0,0243
MgO	0,0123
Fe ₂ O ₃	0,0002
Cl	0,4832
P ₂ O ₅	0,0814
Summe der anorganischen Stoffe	1,4144
Sauerstoffäquivalent des Cl	0,1090
	<hr/> 1,3054

100 Gewichtstheile des bei 120° C. getrockneten Knorpelgewebes enthielten:

Organische Substanz	81,9224
Anorganische Substanz	18,0776
K ₂ O	2,1322
Na ₂ O	9,1258
CaO	0,3370
MgO	0,1700
Fe ₂ O ₃	0,0027
Cl	6,6918
P ₂ O ₅	1,1278
Summe der anorganischen Bestandtheile	19,5873
Sauerstoffäquivalent des Chlors	1,5097
	<hr/> 18,0776

100 Gewichtstheile der Asche enthielten:

K ₂ O	11,795
Na ₂ O	50,481
CaO	1,864
MgO	0,940
Fe ₂ O ₃	0,015
Cl	37,017
P ₂ O ₅	6,239
	<hr/> 108,351
Sauerstoffäquivalent des Chlors	8,351
	<hr/> 100,000

Ich kann also die Angabe der Herren Petersen und Soxhlet nicht bestätigen. Wie ein so grosser Fehler hat entstehen können, ist mir um so weniger erklärlich, als den Analysen der genannten Autoren keine Zahlenbelege beigesetzt sind. Ich habe alle Bestimmungen doppelt ausgeführt mit zur genauen Analyse ausreichenden Substanzmengen, wie die folgenden Zahlenbelege lehren.

Die von mir befolgten analytischen Methoden waren die in meinen früheren Mittheilungen bereits ausführlich beschriebenen.¹⁾

Zahlenbelege.

1. 3,3653 g des frischen Knorpels gaben bei 120° C. bis zur Constantz des Gewichtes getrocknet 0,2432 g Rückstand = 7,227%.

2. 3,5550 g des frischen Körpers gaben 0,2565 g Rückstand = 7,215%.

Mittel aus beiden Bestimmungen: 7,221% Trockensubstanz.

1. 2,3335 g des bei 120° C. getrockneten Knorpels gaben 0,4820 KCl + NaCl; daraus 0,2534 KPtCl₃; daraus berechnet 0,04884 K₂O und 0,21458 Na₂O; auf 100 g Trockensubstanz kommen 2,0928 K₂O und 9,1955 Na₂O; auf 100 g der frischen Substanz kommen 0,15113 K₂O und 0,66402 Na₂O.

2. 2,1096 Trockensubstanz gaben 0,4328 KCl + NaCl und 0,2377 KPtCl₃; auf 100 g Trockensubstanz 2,1715 K₂O und 9,056 Na₂O; auf 100 g der frischen Substanz 0,1568 K₂O und 0,6540 Na₂O.

Mittel aus beiden Bestimmungen: auf 100 g der frischen Substanz 0,1540 K₂O und 0,6590 Na₂O; auf 100 g Trockensubstanz 2,1322 K₂O und 9,1258 Na₂O.

1. 5,3670 g Trockensubstanz gaben 1,4557 AgCl; daraus berechnet 6,7075% Cl der Trockensubstanz und 0,48436% Cl der frischen Substanz.

2. 1,2972 g Trockensubstanz gaben 0,3502 AgCl; daraus berechnet 6,676% Cl der Trockensubstanz und 0,48206% Cl der frischen Substanz.

Mittel: 6,6917% Cl der Trockensubstanz und 0,48321% Cl der frischen Substanz.

11,2162 g Trockensubstanz gaben 0,0006 FePO₄, 0,0378 CaO, 0,0529 Mg₂PO₇ + 0,1444 Mg₂PO₇; daraus berechnet: auf 100 Trockensubstanz 0,0027 Fe₂O₃, 0,16996 MgO, 0,3370 CaO und 1,1278 P₂O₅; auf 100 frischer Substanz 0,0002 Fe₂O₃, 0,02434 CaO, 0,01227 MgO und 0,08144 P₂O₅.

1) Bunge, Zeitschr. f. Biologie, Bd. X, S. 296, 1874 u. Liebig's Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 172, S. 16, 1874. Vergl. auch Behaghel von Adlerskron, Zeitschr. f. anal. Chem., Jahrg. 12, Heft 4, 1873.

Ueber die Wirkung des Arginins auf tryptische Verdauung der Eiweisskörper.

Von
Dr. D. Lawrow.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juli 1899.)

Nachdem in neuerer Zeit festgestellt worden ist, dass durch die Wirkung des Trypsins auf Eiweiss und Protamin eine beträchtliche Menge basischer Stoffe gebildet werden,¹⁾ erhebt sich die Frage, wie diese Produkte den weiteren Gang der Trypsinverdauung beeinflussen. Es ist bekannt, dass dieser enzymatische Process am schnellsten bei einer durch kohlen-saures Natron hervorgerufenen schwach alkalischen Reaction der Flüssigkeit verläuft. Es scheint, als ob man bisher im Wesentlichen das in Galle, Pankreassaft und «Darmsaft» vorhandene Alkalicarbonat und die durch Fäulnissprocess im Darmkanal gebildeten Basen als diejenigen Stoffe angesehen hat, welche im Stande sind, die saure Reaction der aus dem Magen kommenden Massen allmählich abzustumpfen und eine alkalische Reaction hervorzurufen.

Für die Beurtheilung der Trypsinverdauung wäre es von einigem Interesse, wenn man den Nachweis führen könnte, dass der Process der Trypsinverdauung auf diese Hülfsmittel nicht angewiesen ist; dass die durch Trypsinverdauung selbst erzeugten basischen Stoffe—die «Hexonbasen»²⁾—nicht nur die durch andere

¹⁾ Hedin, Archiv für Physiol. von du Bois Reymond, 1891.
A. Kossel und A. Mathews, diese Zeitschr., Bd. XXII. Kutscher, diese Zeitschr., Bd. XXV.

²⁾ A. Kossel, diese Zeitschr., Bd. XXV.

Produkte hervorgerufene saure Reaction fortschaffen können, sondern dass sie auch den Fortgang dieses Processes direkt unterstützen, indem sie selbst die für eine kräftige Verdauung erforderliche alkalische Reaction liefern. Liesse sich der Nachweis führen, dass die Trypsinverdauung durch die Gegenwart der Hexonbasen beschleunigt wird, so würden wir hier einen Process vor uns haben, der, wenn er bei neutraler oder schwach saurer Reaction beginnt, sich selbst, ähnlich wie der Verbrennungsprocess, bis zu einer gewissen Höhe steigern muss.

Von diesen Gesichtspunkten aus habe ich auf Veranlassung des Herrn Prof. A. Kossel zunächst Versuche mit einer Hexonbase, dem Arginin, angestellt.

Die nöthige Menge von Arginin wurde mir von Herrn Prof. A. Kossel in Form des Carbonats gütigst zur Verfügung gestellt, aus welchem ich zunächst durch folgendes Verfahren freies Arginin darstellte.

Eine wässerige Lösung von reinem kohlen sauren Arginin wurde mit einer genau bekannten Menge von verdünnter, durch Barytwasser titrirter Schwefelsäure angesäuert, auf kochendem Wasserbade bis zur vollständigen Austreibung der Kohlensäure etwa eine Stunde gehalten, nachher mit der zur Sättigung der gesammten Schwefelsäure erforderlichen Menge Barytwasser gemischt und in einem zugeschlossenen Kolben mehrere Stunden stehen gelassen. Darauf wurde die Alkalescenzen der filtrirten Lösung durch Titriren mit $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure ermittelt.

Ich habe diese Lösung benutzt, um fünf Argininlösungen von verschiedener Alkalescenzen darzustellen, indem ich die ganz genau abgemessenen Mengen der genannten Lösung von Arginin mit den ganz genau abgemessenen Mengen von destillirtem Wasser gemischt habe. Zu je 25 ccm. von erhaltenen Lösungen wurde 0,15 g Trypsinum sicc. von Grübler, eine gewisse Menge von geronnenem Eiereiweiss und zwei Tropfen Chloroform hinzugefügt und die Proben wurden bei Brutttemperatur etwas über 12 Stunden gehalten. Darauf wurde von jeder Probe das ungelöste Eiweiss abgetrennt, mit heissem Wasser

ausgewaschen und mit dem Filter bis zum constanten Gewicht bei 100—105° getrocknet.

Die Filter waren vorher bei 100—105° bis zum constanten Gewicht getrocknet und gewogen.

Um die durch Arginin bewirkte alkalische Reaction mit durch kohlensaures Natron hervorgerufenen zu vergleichen, stellte ich folgende Versuche an. Je 25 ccm. Trypsinlösung wurden mit genau bekannten Mengen Natriumcarbonat versetzt und ebenso, wie eben beschrieben, zur Eiweissverdauung benutzt.

Die Resultate der Beobachtungen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

	Alkalescentz ¹⁾	Menge des benutzten geronnenen Eiereiweisses	Menge des ungelösten Eiereiweisses
Die Arginin	8,8	0,076	0,02 = 26 %
enthaltenden	17,7	0,080	0,015 = 19 %
	34,85	0,075	0,01 = 13 %
Lösungen	69,7	0,081	0,035 = 43 %
	104,0	0,081	0,040 = 49 %
Die kohlensaures	8,8	0,080	0,015 = 19 %
Natron	17,6	0,078	0,01 = 13 %
enthaltenden	34,86	0,085	0,02 = 23 %
	70,0	0,081	0,02 = 25 %
Lösungen	105,0	0,081	0,04 = 49 %
Controllprobe	0,00	0,075	0,03 = 40 %

Diese Versuche ergaben mit Sicherheit, dass das Arginin einen Einfluss auf die eiweisslösende Wirkung des Trypsins ausübt. Das Optimum der Alkalescentz liegt bei dem Arginin in der Nähe des für das kohlensaure Natron beobachteten Optimums.

¹⁾ Durch die Anzahl Cubikcentimeter $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure, welche zur Neutralisation von 100 ccm. der Lösung erforderlich sind, ausgedrückt.

Eine Anhäufung des Arginins¹⁾ wirkt hemmend (vielleicht unter Umständen regulierend?) auf die Verdauung ein. Diese Wirkungen müssen umsomehr zur Erscheinung kommen, je reicher an Hexonbasen die verdauten Eiweisskörper sind.

Ich habe mich ferner davon überzeugt, dass das Arginin auch bei der Emulgierung der Fette in ähnlicher Weise wirkt wie kohlensaures Natron. Die Pankreasverdauung gewisser Eiweisskörper kann daher auch für die Umwandlung der Fette im Darmkanal von Bedeutung sein.

1) Die wässrige Lösung von Arginin, deren Alkaleszenz pro 100 ccm. durch 40 ccm. $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure zu schätzen ist, enthält nach meinen zwei Bestimmungen 0,74% freies Arginin.

Ueber einen histonähnlichen Körper aus Thymus.

Von
A. Fleroff.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 21. Juli 1899.)

Nachdem durch die Untersuchungen von A. Kossel¹⁾ eine engere Beziehung des Histons zu den Protaminen wahrscheinlich gemacht worden ist, erhebt sich die Frage, ob in gewissen thierischen Geweben, die eine reichliche Menge von Histon enthalten, neben diesem auch Protamin nachgewiesen werden kann.

Auf Veranlassung von Prof. A. Kossel habe ich zur Untersuchung dieser Frage Thymusgewebe mit denjenigen Methoden behandelt, welche von demselben²⁾ für die Gewinnung des Protamins aus Fischsperma angegeben sind.

Zunächst verfuhr ich in folgender Weise. Die zerhackte Thymusdrüse wurde mit Alkohol und Aether erschöpft und sodann 48 Stunden lang mit einer 2%igen Schwefelsäure (auf je 100 gr. Thymusdrüse 1000 ccm. Schwefelsäure) extrahirt und der so gewonnene Auszug mit der dreifachen Menge 96%igen Alkohols versetzt. Es entstand ein Niederschlag, welcher im heissen Wasser gelöst und mit pikrinsaurem Natrium in das Pikrat übergeführt wurde.

1) A. Kossel, Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkerns. Diese Zeitschrift, Bd. VIII, 1884, S. 511. Deutsche medicinische Wochenschrift, Jahrgang 1894. Nr. 7, 1898, Nr. 37.

2) A. Kossel, Ueber die Constitution der einfachsten Eiweissstoffe (Diese Zeitschrift, Bd. XXV, 1898).

Das Pikrat wurde sodann mittels 2%iger Schwefelsäure und Aether von der Pikrinsäure befreit und die Lösung von Neuem mit Alkohol gefällt. Diese Fällung wurde behufs weiterer Reinigung zweimal wiederholt. Die auf diese Art erhaltene Substanz stellte ein weisses Pulver dar. Um aus diesem Sulfat die freie Base zu erhalten, wurde der Niederschlag in heissem Wasser gelöst und mit Baryumhydrat im Ueberschuss versetzt. Das überschüssige Baryumhydrat wurde mit Kohlensäure entfernt. Es entstand eine trübe, schlecht filtrirende Lösung. Die Filtration wurde erst möglich, als ich das gleiche Volumen Alkohol und etwas Ammoniak zufügte und nun erwärmte. Das klare Filtrat wurde mit einem Ueberschuss von Alkohol versetzt, wodurch ein schwachgelber Niederschlag erhalten wurde. Derselbe wurde nun durch zweimaliges Auflösen in heissem Wasser und Versetzen mit Alkohol unter Zusatz von Aether gereinigt. Der so erhaltene Körper hatte folgende Eigenschaften.

Die wässerige Lösung desselben reagirte bei gänzlicher Abwesenheit von Ammoniak deutlich alkalisch. Ammoniak fällte ihn in wässriger Lösung selbst im Ueberschuss nicht. Alkohol, im Ueberschuss zugesetzt, bewirkte eine Fällung, die aber schwierig erfolgte und anscheinend unvollständig war: Zusatz von Aether erleichterte diese Fällung. Alkohol, dem eine kleine Menge Ammoniak zugesetzt war, fällte den Körper vollständig. Der Körper gibt die Biuretreaction. Millon's Reagens erzeugte eine kaum wahrnehmbare Rosafärbung. Phosphorwolframsäure, Gerbsäure, Ferrocyankalium mit Essigsäure, pikrinsaures Natrium, Jodquecksilber-Jodkalium, letztere beiden in neutraler oder schwach alkalischer Lösung, fällen den Körper. Jodjodkalium, chromsaures Natrium, Sublimat, Steinsalz (sogar gesättigte Lösung), Zinksulfat (gesättigte Lösung) bewirkten keine Fällung. Albumose in alkalischer Lösung fällte auch nicht. Der Körper gab keine Farbenreaction mit Eisessig und concentrirter Schwefelsäure.

Durch Alkali und kohlen saures Natrium entstand ein Niederschlag, der sich im Ueberschuss des Fällungsmittels schnell löste. Salpetersäure bewirkte keine Fällung. Beim

Kochen der wässerigen Lösung war keine Coagulation bemerkbar, auch nicht auf Zusatz von kohlensaurem Natron. Der erhaltene Körper wurde bei 100° C. bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und analysirt. Die Analyse ergab:

0,2231 g der Substanz gaben 0,4235 CO₂ und 0,1610 H₂O
 0,1583 g „ „ 24,6 ccm. N bei 18° C. und 750,5 mm Bar.
 0,3752 g „ „ 0,05022 g BaSO₄, 0,00689 g S.

Beim Verbrennen auf Platinblech war keine Asche bemerkbar.

C	51,77%
H	8,06%
N	17,72%
S	1,99%
O	20,46%

Da bei der eben beschriebenen Darstellungsweise die Ausbeute sehr gering war, so habe ich es versucht, ein zweites Verfahren zur Gewinnung dieser Substanz ausfindig zu machen. Zu dem Zwecke habe ich die heisse Lösung des Sulfats nicht mit Barythydrat zersetzt, sondern nach vorausgegangener Ueberführung in pikrinsaures Natrium und Rückverwandlung in das Sulfat dieses mit Ammoniak im Ueberschuss gefällt. Hierbei war ich in Folge freundlicher Mittheilungen des Herrn Dr. Levene in der Lage, das folgende, noch nicht publicirte Verfahren zu benutzen, welches Herr Dr. Levene im hiesigen Laboratorium zur Trennung von Histon und Protamin ausgearbeitet hat. Die warme Lösung wurde von dem durch Ammoniak erhaltenen Niederschlag abfiltrirt, der Niederschlag dreimal mit heissem Wasser gewaschen und die ablaufenden Wässer mit dem ersten Filtrat vereinigt. Das Filtrat wurde nun mit einem Ueberschuss von Alkohol gefällt und der Niederschlag in heissem Wasser gelöst. Beim Hinzufügen einer geringen Menge Alkohol zu dieser Lösung entstand eine Trübung; dieselbe wurde abfiltrirt und das Filtrat mit einem Ueberschuss von Alkohol unter Zusatz von Aether gefällt.¹⁾ Der so erhaltene, durch wässeriges Ammoniak und durch wenig Alkohol nicht fällbare, durch

1) Diese Fällung mit Ammoniak und die nachfolgende Behandlung mit Alkohol, sowie die Fällung mit Aetheralkohol wurde viermal wiederholt.

Alkoholäther fällbare Körper entsprach in allen Reactionen dem Körper, der nach der ersten Methode erhalten wurde, doch war die Ausbeute fast zweimal so gross. Der Körper wurde bei 125° C. bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und analysirt. Die Analyse hatte folgendes Ergebniss:

0,2893 g	der Substanz	gaben	0,4555 CO ₂	und	0,1664 H ₂ O
0,2736 g	„ „ „		43 ccm. N	bei 17,5° C. und	749 mm Bar.
C		51,91 %		
H		7,81 %		
N		17,97 %		
O		(20,32 %)	Nach Abzug von	1,99 % S

Der Schwefelgehalt wurde nicht bestimmt.

Demnach stimmt der so erhaltene Körper mit dem ersten in der Zusammensetzung überein.

	I	II.
C 51,77 %	51,91 %
H 8,06 %	7,81 %
N 17,72 %	17,97 %
O (20,46 %)	(20,32 %)

Der durch Ammoniak entstandene Niederschlag wurde mit heissem Wasser sorgfältig ausgewaschen und in einem kleinen Ueberschuss von verdünnter Salzsäure gelöst. Dieser Körper gab alle für das Histon¹⁾ typischen Reactionen, er war in Ammoniak vollständig unlöslich, wurde durch Salpetersäure in der Kälte gefällt, aber nicht beim Erwärmen, durch kohlen-saures Natrium wurde er coagulirt, zeigte deutlich die Millon'sche Reaction, löste sich gar nicht beim Füllen mit Ammoniak im heissen Wasser und gab auch andere weniger charakteristische Histonreactionen. Aus der salzsauren Lösung wurde der Körper mit einem Ueberschuss von Ammoniak gefällt und der Niederschlag so lange mit heissem Wasser ausgewaschen, bis das ablaufende Wasser keinen Gehalt an Chlor und Ammoniak mehr zeigte. Der bei 100° C bis zur Gewichts-

¹⁾ A. Kossel (loco citato).

Lilienfeld, Zur Chemie der Leucocyten (Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, 1894, S. 473.)

constanz getrocknete Körper wurde analysirt. Er stellt ein weisses Pulver dar. Die Analyse gab folgende Werthe:

0,2234 g der Substanz gaben 0,4290 CO₂ und 0,1550 H₂O
 0,2248 g „ „ „ 36,8 ccm. N bei 17° C. und 750 mm. B.
 0,4705 g „ „ „ 0,0212 g BaSO₄, 0,002902 S.

C	52,37 %
H	7,70 %
N	18,35 %
S	0,62 %
O	20,96 %

Wenn man die Werthe dieser Analyse mit denen von A. Kossel¹⁾ und Lilienfeld¹⁾ angegebenen mittleren Werthen vergleicht, so findet man eine nahe Uebereinstimmung.

Das von mir erhaltene Histon.	Histon v. A. Kossel.	Histon v. Lilienfeld.
C . . . 52,37 %	52,31 %	52,34 %
H . . . 7,70 %	7,20 %	7,81 %
N . . . 18,35 %	18,46 %	
S . . . 0,62 %	0,50 %	

Der von mir aus der Thymusdrüse neu dargestellte Körper, den ich als «Parahiston» bezeichnen will, unterscheidet sich, wie man aus den gegebenen Werthen der Analyse ersieht, deutlich von Histon, hauptsächlich durch seinen grösseren Gehalt an Schwefel.

Parahiston (im Mittel)	Histon
C 51,84 %	52,37 %
H 7,93 %	7,70 %
N 17,84 %	18,35 %
S 1,99 %	0,62 %
O 20,46 %	20,96 %

Ferner unterscheidet sich das «Parahiston» vollständig durch die Reactionen einerseits vom Histon, anderseits vom Protamin.

Ivar Bang²⁾ weist auf die Fähigkeit des Histons hin sich bei Abwesenheit von Ammoniaksalzen im Ueberschuss von

¹⁾ l. c.

²⁾ Ivar Bang, Studien über Histon (Diese Zeitschrift. Bd. XXVII, Heft 6).

Ammoniak zu lösen. Die von A. Kossel¹⁾ angegebene Fällung durch Ammoniak tritt nach Bang nur bei Anwesenheit von Ammoniaksalzen ein.

Diese Reaction und die anderen von Ivar Bang²⁾ angeführten Reactionen, wie Coaguliren beim Erhitzen und Fällern mit Salpetersäure, zeigt das von mir erhaltene «Parahiston» nicht. Es löst sich in Ammoniak sowohl bei Abwesenheit als auch Anwesenheit von Ammoniaksalzen. —

Fassen wir die Resultate obiger Untersuchung zusammen, so sehen wir, dass sich auf die beschriebene Weise aus der Thymusdrüse bei Behandlung mit Schwefelsäure zwei basische eiweissartige Körper ausziehen lassen, welche durch Ammoniak getrennt werden konnten. Der eine Körper ist im Ueberschuss von Ammoniak und Wasser unlöslich und stellt seinen Eigenschaften nach Histon dar, der andere, das «Parahiston», ist in Ammoniak und Wasser leicht löslich und unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung und seinen Reactionen von Histon. Es ist sehr leicht möglich, dass das durch Fällung mit Alkohol und Aether erhaltene wasserlösliche Histon, welches durch Zersetzung von Nucleohiston erhalten wurde, das «Parahiston» als Verunreinigung enthalten hat. Bei der Reinigung dieses «Parahistons» scheidet sich noch ein dritter Körper ab, welcher in Alkohol sehr schwer löslich ist. Diesen Körper näheren Untersuchungen zu unterziehen, ist mir wegen der geringen Menge, in der ich ihn erhielt, nicht gelungen. Ich will hier nur bemerken, dass er die Fähigkeit besitzt, Eiweiss (Wittesches Pepton) zu fällen.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Professor A. Kossel meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen für seine freundlichen Rathschläge und für die Aufmerksamkeit, mit der er meine Arbeit verfolgte.

Marburg den 21. Juli 1899.

1) A. Kossel (l. c.)

2) I. Bang (l. c.)

Ein Beitrag zur Kenntniss der Protamine.

Von

Dr. N. Morkowin.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 22. Juli 1899.)

Nachdem durch die Untersuchungen von Miescher im Jahre 1874 gezeigt war, dass die Spermatozoen des Lachses einen eigenthümlichen basischen Körper, das «Protamin», enthalten, hat A. Kossel später dargethan, dass wir in dieser Base den Repräsentanten einer Gruppe verschiedenartiger, aber nach dem gleichen Typus gebauter chemischer Produkte vor uns haben. A. Kossel hat ferner erwiesen, dass diese chemische Gruppe der Protamine eine grosse Bedeutung für das Verständniss des chemischen Baues vom Eiweissmolekül besitzt.

Die bisher bekannten Protamine sind folgende: das Salmin aus den Spermatozoen des Lachses (Miescher 1874),¹⁾ das damit höchstwahrscheinlich identische Clupein (Kossel 1897),²⁾ das dem Salmin und Clupein sehr ähnliche Scombrin aus dem Sperma der Makrele (Kurajeff 1898),³⁾ das Sturin aus dem Störsperma (Kossel 1897).⁴⁾ Endlich kann als Zwischenglied den Protaminen und den Histonen das von Mathews (1897)⁵⁾ im hiesigen Laboratorium aus den Spermatozoen eines Seeigels (Arbacia) dargestellte Arbacin genannt werden. Im Salmin, Clupein und Scombrin ist nach den Untersuchungen von Kossel nur eine Hexonbase, das Arginin, vorhanden; im Sturin hingegen sind 3 Hexonbasen: Histidin, Arginin und Lysin nachgewiesen worden. Diese Körper enthalten neben den Hexonbasen noch einen nicht ganz aufgeklärten Atomcomplex, der zum Theil zur Bildung einer Amidovaleriansäure Ver-

1) Fr. Miescher, Die histochemischen und physiol. Arbeiten. S. 66. Leipzig 1897.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 66.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 165.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 399.

5) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 524.

anlassung gibt. Alle diese Substanzen enthalten die aromatische Gruppe nicht, geben also auch keine Rothfärbung mit Millon's Reagens. Wohl aber entsteht eine solche Rothfärbung beim Arbacin. Letzteres unterscheidet sich von den bisher bekannten Protaminen auch durch seinen viel geringeren Stickstoffgehalt. Während die Protamine im Durchschnitt 24,5% Stickstoff enthalten, kommt dem Arbacin nur ein Gehalt von 15,91% N zu.

Zur Aufklärung dieser Körpergruppe und ihres Verhältnisses zu den höheren Eiweisskörpern ist die Auffindung von neuen Protaminen und besonders von Zwischengliedern zwischen Protaminen und den höheren basischen Eiweisskörpern, den Histonen, von grossem Interesse. Durch die folgenden Untersuchungen ist ein neues Protamin charakterisirt worden, welches gewisse Eigenschaften mit den höheren Eiweisskörpern gemein hat.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. A. Kossel, dem ich hiermit meinen aufrichtigsten Dank ausspreche für seinen freundlichen Beistand während meiner Arbeit und für das mir von ihm gütigst zur Verfügung gestellte Material, versuchte ich nach der Methode desselben, aus dem Sperma vom «Seehasen» (*Cyclopterus lumpus*) einen protaminähnlichen Körper zu gewinnen.

Mir standen 45 g des mit Alkohol und Aether extrahirten Spermas zu Gebote. Diese wurden sechsmal mit einprocentiger Schwefelsäure ausgezogen, indem jedes Mal $1\frac{1}{4}$ Stunde lang geschüttelt wurde; das Filtrat wurde mit der dreifachen Menge 95%igen Alkohols versetzt. Nachdem die Fällung des wieder aufgelösten Niederschlages mit Alkohol fünfmal wiederholt worden war, erhielt man eine weisse, klebrige, sehr hygroskopische Masse. Diese wurde in Wasser gelöst und mit pikrinsaurem Natrium gefällt; das erhaltene Pikrat abgetrennt, ausgewaschen und durch Behandlung mit Schwefelsäure und Alkohol in das Sulfat übergeführt. Die Umwandlung in das Sulfat geht sehr schwer und nur bei Anwesenheit kleiner Mengen Alkohol vor sich. Das erhaltene Sulfat wurde mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Die Fällung des Sulfats mit Alkohol wurde viermal wiederholt. Das auf diese Art erhaltene

Sulfat wurde im Wasser gelöst in einen Scheidetrichter gebracht und 12 Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit schieden sich aus der Lösung dunkelbraune Oeltröpfchen aus. Diese geringe Menge jedenfalls noch unreiner Substanz wurde entfernt und die Flüssigkeit, welche bei Zimmertemperatur weiter keine Ausscheidung gab, stark abgekühlt. Bei 12° C. begann eine neue Abscheidung, der grössere Theil des Körpers fiel bei 8°—5° C. aus, bei 2° C. war Alles ausgeschieden. Das erhaltene Sulfat, ein dickflüssiges, hellbraunes Oel, welches in Wasser löslich ist, reagirt, bei Abwesenheit freier Mineralsäure, sauer: es gibt eine intensive Millon'sche Reaction, ohne in der Wärme einen Niederschlag zu bilden; letzterer fällt erst beim Abkühlen rosafarben aus. Ferner gibt die Lösung Biuretreaction mit rosa Farbenton: sie wird gefällt durch Alkohol, pikrinsaures Natrium, Ferrocyankalium, Jodjodkalium, Kaliumchromat. Ein Niederschlag entsteht, wenn man die Lösung mit Kochsalz und Ammoniumsulfat sättigt; Ammoniak fällt die Substanz nicht: Salpetersäure bewirkt bei Gegenwart kleiner Mengen Kochsalz keine Fällung. Witte-Pepton ruft bei Anwesenheit von Ammoniak einen Niederschlag hervor.

Für den durch diese Reactionen charakterisirten Körper schlage ich den Namen «Cyclopterin» vor.

Cyclopterinsulfat wurde zuerst im Vacuum, dann bei 100 bis 110° C. getrocknet und analysirt. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,2035 g Substanz geben 0,3136 g CO₂ und 0,1264 g H₂O
 0,4691 „ „ „ 0,7220 „ CO₂ „ 0,2766 „ H₂O
 0,1469 „ „ „ 28 ccm. N₂ bei 16,5° C. und 750,5 mm. Bar.
 0,1444 „ „ „ 28,6 „ N₂ „ 17° „ „ 747 „ „
 0,2042 „ „ „ 0,1223 g BaSO₄
 0,2080 „ „ „ 0,1218 „ BaSO₄.

C	42,03	41,97				
H	6,90	6,57				
N			22,08	22,67		
S		.			8,19	8,01

Da die Menge des zur Verfügung stehenden Materials

nur eine geringe war, musste ich mich mit diesen Analysen begnügen. Ich verzichte auf die Berechnung einer Formel: die Discussion derselben muss bis zur Gewinnung weiterer Resultate verschoben werden.

Nach diesen Ergebnissen nimmt das Cyclopterin eine isolirte Stellung ein. Es ist eine Substanz, die unzweifelhaft zu den Protaminen gehört. Insbesondere zeigt sie die sehr charakteristische, von A. Kossel aufgefundene Eigenthümlichkeit der Protamine, dass sich das Sulfat als Oel aus der wässerigen Lösung beim Erkalten und auf Zusatz von Aether ausscheidet. Andererseits unterscheidet es sich aber von den bisher bekannten Protaminen wesentlich dadurch, dass es die Millon'sche Reaction gibt und bedeutend weniger Sauerstoff enthält. Von Arbacin unterscheidet es sich durch seinen hohen Stickstoffgehalt, von den meisten Histonen unter Anderem auch dadurch, dass es frei von Schwefel ist, und dass es durch Ammoniak nicht gefällt wird.

Man könnte vielleicht in Anbetracht der Millon'schen Reaction dieses Körpers zu der Ansicht kommen, dass das Cyclopterin eine chemische Verbindung von Protamin mit einem die Millon'sche Reaction ergebenden Propepton oder Pepton darstelle.

Um diese Frage zu entscheiden, stellte ich mir eine Mischung von Protamin mit Propepton und peptonartigen Körpern dar und wies nach, dass das von mir zur Darstellung des Cyclopterins befolgte Verfahren aus diesen Gemischen nicht eine Verbindung von Protamin und peptonartigen Stoffen, sondern reines propepton- und peptonfreies Protamin ergibt.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt. 1,45 g Clupeinsulfat wurde in Wasser gelöst und mit der gleichen Menge einer Lösung von Witte-Pepton versetzt; die Lösung wurde eingedampft; aus der ziemlich concentrirten Flüssigkeit schied sich ein im Wasser lösliches Oel aus. Die Lösung dieses Oels gibt die Millon'sche und die Biuretreaction und wird durch Jodjodkalium, Ammoniak etc. gefällt, bestand somit aus einer Mischung oder einer chemischen Verbindung von Protamin und Pepton. Die wässerige Lösung dieses Oels wurde

mit Alkohol versetzt und der Niederschlag wieder gelöst. Aus dieser Lösung schied sich bei Anwesenheit von Aether bei 2—5° C. ein Oel aus, dessen Lösung alkalisch reagierte, keine Millon'sche Reaction, aber deutlich die Biuretreaction gab, welches ferner durch Jodjodkalium, Ferrocyankalium, Quecksilberchlorid, Kaliumchromat und Alkohol gefällt wurde. Es war also peptonfreies Protamin abgeschieden.

Zu dem gleichen Resultat führte der folgende Versuch. Aus 0,5 g Clupeinsulfat wurde freies Clupein dargestellt. Dasselbe wurde mit einer Lösung von Witte-Pepton gemischt und der erhaltene Niederschlag unter Erwärmen in Wasser gelöst, nach Zusatz von Aether fiel aus dieser Lösung ein Oel aus. Das erhaltene Oel wurde von der Lösung getrennt, in Wasser gelöst und aus dieser Lösung bei 2—5° C. ausgeschieden. Die Lösung dieses Oels färbte sich nicht durch die Millon'sche Reaction, gab eine deutliche Biuretreaction und wurde durch sämtliche Reagentien gefällt, durch welche die Protamine ausgeschieden werden.

Ein dritter Versuch war folgender: Eine Lösung von 0,4 g Clupeinsulfat wurde mit einer Lösung von Histon in 2%iger Schwefelsäure gemischt, die Lösung mit Alkohol versetzt und der erhaltene Niederschlag filtrirt. Nach dem Auswaschen wurde der letztere in heissem Wasser gelöst und eingedampft. Aus der ziemlich concentrirten zurückbleibenden Lösung schied sich unter Zusatz von Aether bei 0° C. ein ganz klares Oel aus. Die Lösung dieses Oels gab keine Millon'sche Reaction, eine deutliche Biuretfärbung, alle Fällungsreactionen der Protamine.

Man erhält also aus dem Gemisch des Protamins mit Propepton und Pepton oder mit Histon nach dem oben beschriebenen Verfahren reines Protamin, keine Verbindung von Protamin mit diesen Stoffen. Die Auffassung des Cyclopterins als einer lockeren Verbindung von Protamin mit einem peptonartigen Stoff, welche schon durch die Analysenwerthe unwahrscheinlich gemacht wird, ist somit auch nach diesen Versuchen nicht statthaft.

Marburg, 22. Juli 1899.

Ueber den blutdruckerregenden Bestandtheil der Nebenniere, das Epinephrin.

Von
John J. Abel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Johns Hopkins University, Baltimore.)
(Der Redaction zugegangen am 24. Juli 1899.)

Es ist etwa ein halbes Jahrhundert her, dass die grosse Wichtigkeit der Nebenniere erkannt wurde, und seither hat dieses Organ in hervorragendem Grade die Aufmerksamkeit der medicinischen Welt auf sich gezogen.

Im Jahre 1855 beschrieb Addison¹⁾ die allgemeinen und lokalen Wirkungen der Erkrankung der Nebenniere und fügte die Morbus Addisonii zur Reihe der in ihren Ursachen erkannten Krankheiten. Ein Jahr später beobachtete Vulpian,²⁾ dass der ausgepresste Saft dieses Organs von verschiedenen Thieren sich in charakteristischer Weise gegen Eisenchlorid und Jodlösung verhielt und nirgends anders im Thier ähnliche Reactionen zu erhalten sind. Zur selben Zeit zeigte Brown-Séquard,³⁾ dass die Entfernung der Nebennieren aus dem Thier den Tod nach sich zieht.

Im Jahre 1894 fanden Schäfer und Oliver⁴⁾ und bald darauf Scymonowicz und Cybulski,⁵⁾ dass schon eine sehr geringe Dosis des wässerigen Nebennierenextracts hinreicht.

1) Dr. Addison's Works, New Sydenham Society (1868), S. 211.

2) Compt. rendus. Acad. d. sc., Paris, Bd. 93 (1856), S. 663—665.

3) Ibid. (1856), S. 422, 542.

4) Journal of Physiology, Bd. 16 (1894), Bd. 18 (1895).

5) N. Cybulski: Weitere Untersuchungen über die Function der Nebenniere. Anz. d. Akad. d. Wissensch. in Krakau, 4. März 1895, citirt aus L. Sczymonowicz Arch. f. die gesammte Physiol., Bd. 64, S. 149.

den Blutdruck sehr bedeutend zu erhöhen, was seither von mehreren andern Beobachtern bestätigt wurde. Schäfer und Oliver¹⁾ haben ferner festgestellt, dass bei weitgehender Degenerirung des Markes der Nebenniere das Extract sämtliche physiologische Wirkungen eingeüsst hat.

Auch die Isolirung des wirksamen Bestandtheils und die Feststellung seiner chemischen Eigenschaften bildeten den Gegenstand von Untersuchungen. Vulpian und Cloëz,²⁾ Virchow,³⁾ Arnold,⁴⁾ Seligsohn,⁵⁾ Holm,⁶⁾ Krukenberg,⁷⁾ Brunner,⁸⁾ Radziejewsky,⁹⁾ Mühlmann,¹⁰⁾ Metzger,¹¹⁾ Gürber,¹²⁾ Fraenkel,¹³⁾ Moore¹⁴⁾ und v. Fürth¹⁵⁾ mögen in dieser Beziehung erwähnt werden. Ich habe bereits in früheren Publicationen mehrere dieser früheren und neueren Arbeiten beleuchtet und einige der neueren Abhandlungen wurden auch von O. v. Fürth¹⁶⁾ kritisch besprochen. Aber so vortrefflich auch viele der Abhandlungen waren, haben sie doch wichtige Fragen nicht aufgeklärt und manche frühere Schlussfolgerungen wurden seither als irrig erkannt. Das Problem bot grosse Schwierigkeiten dar.

In meiner ersten Abhandlung, der Association of American Physicians, mitgetheilt am 6. Mai 1897, und in Johns Hopkins Hospital Bulletin vom Juli 1897 veröffentlicht, habe ich be-

1) Loc. cit., Bd. 18 (1895), S. 269.

2) Compt. rend., Acad. d. sc., Paris (1857), Bd. 94, S. 340—343.

3) Virchow's Archiv, Bd. 12 (1857), S. 481—483.

4) Ibid., Bd. XXXV (1866), S. 64—107.

5) Ibid., Bd. XVIII (1860), S. 355.

6) Journ. f. pract. Chemie, Bd. 100 (1867), S. 150.

7) Virchow's Archiv, Bd. 101 (1885), S. 542—591.

8) Schweizer. Wochenschr. f. Pharm., Bd. 30, 1892, S. 121—123.

9) Deutsche med. Wochenschr., 1898, S. 575.

10) Deutsche med. Wochenschr., 1896, Nr. 26, S. 409—411.

11) Zur Kenntniss der wirksamen Substanzen der Nebennieren.

Diss. Würzburg 1897.

12) Münch. med. Wochenschr., 1897, S. 750.

13) Wiener med. Blätter, 1896, Nr. 14—16.

14) Journal of Physiology, vol. 21, No. 4 and 5 (1897).

15) Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 142.

16) Ibid., Bd. XXVI, S. 15.

wiesen, dass die blutdrucksteigernde Substanz weder Brenzkatechin ist, wie Mühlmann vermuthet hat, noch ein unmittelbares Derivat davon, obwohl ich zugab, dass unter den Produkten der Fäulniss des Saftes sich etwas Brenzkatechin befinden könnte. Mühlmann hat die Prüfung auf Brenzkatechin nicht vollständig durchgeführt. Obgleich einige Reactionen darauf zu deuten scheinen, so fehlt doch vor Allem die Fähigkeit, reducirend auf Fehling's Lösung zu wirken. Auch unterscheidet sich die blutdrucksteigernde Substanz von Brenzkatechin durch seine Fähigkeit, Salze zu bilden, Farbenreactionen mit Alkaloidreagentien zu geben, sowie in anderer Weise. Sowohl v. Fürth als auch Metzger haben, ohne Kenntniss von meinen Arbeiten zu haben, meine Ansicht ebenfalls bestätigt. Wir können sicher sein, Brenzkatechin ist nicht in der Nebenniere vorhanden.

Ich habe bereits in meiner erwähnten Abhandlung gezeigt, dass man bei Benzoylirung nach Schotten-Baumann den wirksamen Stoff der Nebennieren aus seiner wässerigen Lösung abscheiden kann. Das Filtrat von dieser Benzoylverbindung gibt keine charakteristische Reactionen mehr, und anstatt Erhöhung des Blutdrucks wird im Gegentheil ein Sinken beobachtet. Aus der erwähnten Benzoylverbindung konnte ich den wirksamen Bestandtheil mit allen seinen charakteristischen Eigenschaften regeneriren und schliesslich ein noch unreines Sulfat des sich wie ein Alkaloid verhaltenden Körpers darstellen. In einer zweiten Abhandlung, veröffentlicht in der September—October-Nummer des Johns Hopkins Hospital Bulletin 1898, habe ich ausser weiterer Bestätigung und Vervollständigung meiner früheren Befunde mitgetheilt, dass es mir gelungen ist, das blutdrucksteigernde Princip in Form reiner Salze zu isoliren.

I. Epinephrin.

Hyrtl¹⁾ hat für den Ausdruck «Nebenniere» die Bezeichnung Epinephris vorgeschlagen, da dieses Organ mit der Niere gar nichts zu thun hat. Ich nenne daher die blut-

¹⁾ Lehrbuch der Anatomie des Menschen, 17. Aufl., S. 775.

drucksteigernde Substanz in Uebereinstimmung mit Hyrtl's Nomenclatur Epinephrin. Ich habe die Ueberzeugung, dass ein gründlicheres Studium dieser Verbindung Licht auf die Symptome der Addison'schen Krankheit werfen wird, Symptome, welche in vielen Beziehungen an Zustände erinnern, die wir als Autointoxicationen bezeichnen.

Benzoylderivat des Epinephrins.

Ich habe bereits in meiner zweiten Abhandlung ausführlicher die Bereitung des rohen Benzoylproduktes beschrieben. Nachdem ich verschiedentlich versucht hatte, bessere Methoden zu finden, bin ich auf meine frühere Methode zurückgekommen, habe jedoch beobachtet, dass es gerathen ist, höher concentrirte Extracte bei der Benzoylirung zu vermeiden. Je verdünnter die Lösungen, desto freier ist das Produkt von fremden Benzoaten. Ich verwendete meist Extracte von der Stärke, dass 20 l das Epinephrin von 50 kg der Epinephris des Rindes enthielten. Obgleich das Epinephrin in der frischen Drüse nur zu etwa 0,01% enthalten ist, ist es dennoch leicht, jede Spur als Benzoylverbindung auszufällen. Ich habe es als zweckmässig befunden, Anfangs eine grössere Menge Benzoylchlorid zuzusetzen, dann nur wenig einer 10%igen Aetznatronlösung, hierauf energisch zu schütteln und nach einigen Minuten wieder eine kleine Menge des Alkalis zuzusetzen und wieder zu schütteln, und dieses so oft zu wiederholen, bis die Rosafärbung nicht mehr erhalten wird.

Das Filtrat zeigt zwar bei weiterer Benzoylirung auch noch Niederschläge; dieselben gehören jedoch andern Körpern an, über die ich später weitere Mittheilungen machen werde.

Dass durch die Benzoylirung das active Princip aus der Lösung entfernt wurde, ging aus folgender Probe hervor: Das Filtrat wurde nach Ansäuern mit Salzsäure von der Benzoesäure durch Ausschütteln mit Aether befreit und nach Neutralisation in kleiner Menge in die Jugularvene eines Hundes injicirt, worauf ein rasches und beträchtliches Sinken¹⁾ des

1) Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, July 1897, p. 153.

Blutdruckes folgte, also gerade das Gegentheil von der Wirkung des Epinephrins. Metzger¹⁾ hat auch beobachtet; dass die Nebenniere sowohl eine blutdruckerniedrigende als eine blutdrucksteigernde Substanz enthält, hält es aber für unentschieden, ob jene ein künstliches Produkt, entstanden durch die verschiedenen Manipulationen mit dem Nebennierenextract, oder ein vorgebildeter Bestandtheil ist.

Das nach meiner früheren Vorschrift²⁾ gereinigte Benzoat bildet eine hellgelbe harzige Masse von viel grösserer Beständigkeit als die Acetylverbindung und kann im Wasserbade beliebig lange erwärmt werden, ohne Spuren von Zersetzung zu erleiden. Es ist frei von Benzoylchlorid und Benzaldehyd, löst sich leicht in Alkohol und Essigäther, weniger leicht in Aethyläther, und kann durch Zusatz des letzteren partiell ausgefällt werden, worauf man eine weitere Reinigung basiren könnte.

Obgleich unter den beschriebenen Umständen wahrscheinlich nur eine Monobenzoylverbindung erhalten wird, kann doch noch nicht geschlossen werden, dass nur ein einziges ersetzbares Wasserstoffatom vorhanden sei, und es kann wohl sein, dass man weitere Benzoylgruppen einführen kann, wenn reines Epinephrinsalz mit Benzoylchlorid und Natriumalkoholat nach Claisen's Methode,³⁾ oder mit Benzoessäureanhydrid und Natriumbenzoat nach Goldschmiedt und Hemmelmayr⁴⁾ behandelt wird. Weiter unten wird gezeigt werden, dass ein Triacetylderivat erhalten werden kann, wenn das Epinephrinsulfat acetylirt wird.

Die verschiedenen Produkte, welche bei der Reinigung des rohen Benzoats entfernt werden, wurden noch nicht eingehend von mir untersucht. Es befindet sich darunter auch ein in schönen Prismen krystallisirendes Benzoylprodukt. Ueber ein Produkt von coniinartigem Geruch, welches bei der Benzoylirung bei Gebrauch von zu concentrirtem Alkali entsteht, habe ich früher bereits Andeutungen gemacht.

1) Loc. cit., S. 25.

2) Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, Sept.-Oct. 1898.

3) Berichte der deutschen chem. Ges. Bd. 27, S. 3181.

4) Monatshefte für Chemie Bd. 15, S. 327.

Obleich die Methode, das Epinephrin auf dem Wege über die Benzoylverbindung zu erhalten, etwas umständlich ist, gibt sie doch den besten Weg ab, zu den reinen Salzen zu gelangen. Da die Benzoylverbindung nicht krystallinisch zu erhalten ist, habe ich nur eine einzige Analyse ausgeführt.

0,2966 g Substanz, bei 80° C. über Schwefelsäure in Vacuo getrocknet, gaben 0,78895 g CO₂ und 0,14785 g H₂O. 0,29656 g Substanz von derselben Darstellung gaben 8,7 ccm. N bei 18,25° C. und bei einem Barometerstand von 760 mm.

Gefunden	Berechnet für C ₁₇ H ₁₄ NO ₄ · CO · C ₆ H ₅
C = 72,54%	C = 71,82%
H = 5,54%	H = 4,74%
N = 3,46%	N = 3,49%

Spaltung der Benzoylverbindung.

In meiner ersten Abhandlung habe ich mehrere Methoden mitgetheilt, nach denen ich die Spaltung der Benzoylverbindung vornahm. Ich löste z. B. das Produkt in Eisessig, erhitze bis nahe zum Siedepunkt und goss in diese Lösung dann eine heisse 25%ige Schwefelsäure zu gleichem Volumen in kleinen Portionen ein. Die Mischung wurde dann noch am Rückflusskühler 10 Minuten im Sieden erhalten. Später habe ich die Spaltung mit Wasser im Autoclaven unter einem Druck von 8—12 Atmosphären vorgenommen. Die resultirende Flüssigkeit gibt mit sehr verdünntem Ammoniak einen Niederschlag von Epinephrin, das dann direkt zur Herstellung von Salzen dienen kann. Obwohl die Benzoylverbindung selbst ganz aschefrei ist, so sind doch die auf diese Weise erhaltenen Produkte mit Mineralstoffen, herrührend aus den Gefäßen, in welchen die Spaltung des Benzoylproduktes vorgenommen wurde, verunreinigt. Immerhin lieferten die freie Base und das Benzoat bei der Analyse Resultate, aus denen sich eine Grundlage zur Aufstellung der empirischen Formel ergab.

Ich habe kürzlich gefunden, dass bei Zusatz von 1—2% Schwefelsäure die Spaltung im Autoclaven schon bei 3 bis 5 Atmosphären Druck leicht erfolgt. Die so erhaltenen, sehr wirksamen Lösungen geben stets die schöne Rosareaction mit Jod und nachherigem Ammoniakzusatz, was nicht mehr

oder nur schwach der Fall ist, wenn ein höherer Druck von 8—12 Atmosphären ohne Zusatz von Schwefelsäure angewandt wird. Es entsteht dann bei dieser Probe eine grüne Färbung.

Die unwirksame Modification des Epinephrins und die Ursache der Unwirksamkeit.

Wenn zu der von Benzoesäure befreiten Lösung der gespaltenen Benzoylverbindung sehr verdünntes Ammoniak tropfenweise zugesetzt wird, so entsteht ein voluminöser flockiger Niederschlag von Epinephrin, welcher Anfangs farblos ist, aber bald eine dunkle Farbe annimmt, weshalb man ihn rasch auf dem Saugfilter mit kaltem Wasser, dann etwas kaltem absoluten Alkohol (der jedoch etwas davon löst), dann mit Aether nachwäscht und unter Verreiben im warmen Achatmörser rasch trocknet. Das Epinephrin bildet so ein schwach graues Pulver, fast unlöslich in Wasser, aber leicht löslich in verdünnten Mineralsäuren, Eisessig und Essigsäureanhydrid, und zeigt alle Reactionen des ursprünglichen Epinephrins mit Ausnahme der empfindlichen Rosafärbung mit Jodwasser und Ammoniak. Ich habe dieses getrocknete freie Epinephrin früher für ganz wirkungslos gehalten, allein weitere Versuche mit grösseren Mengen haben indes doch eine schwache Wirkung noch erkennen lassen. So lange die erwähnte Rosafärbung noch mit sehr geringen Mengen erhalten wird, ist auch noch die intensive volle physiologische Wirksamkeit vorhanden. Dieselbe wird aber nicht nur aufgehoben durch Spaltung bei zu hoher Temperatur, sondern auch, wie erwähnt, wenn die Base aus ihren Salzen befreit und getrocknet wird. Ein wirksames Salz büsst aber bei der direkten Umwandlung in ein anderes Salz nichts von seiner Wirksamkeit ein; so habe ich das Sulfat aus der Lösung des Pikrats in Essigäther dargestellt, ohne dass die Wirksamkeit verloren gegangen wäre.¹⁾ Wenn man ferner

¹⁾ So habe ich auch das salzsaure, schwefelsaure und benzoesaure Salz ineinander und in das Pikrat übergeführt, ohne dass Verlust der Wirksamkeit zu beobachten war. Wenn aber das Sulfat auf 110° C. vier Stunden lang erhitzt wird, hat es seine Wirksamkeit zum grössten Theile verloren. Ein solches Präparat brachte erst in 23facher Dosis die normale Wirkung hervor.

die Base aus den Salzen fällt, rasch wäscht und sofort wieder in verdünnten Säuren löst, ist noch eine gewisse beträchtliche Wirksamkeit vorhanden, aber, je länger man die freie Base sich selbst überlässt, je mehr man mit ihr manipulirt, desto mehr nimmt ihre Wirksamkeit ab. Es erinnert dieses Verhalten sehr an die Labilität und leichte Veränderlichkeit des *eso*-Amidoacetophenons, Amidoäthylaldehyds und des Diamidoacetons, welche, aus ihren Salzen befreit, sich sehr bald umlagern.

Analytische Resultate.

Epinephrin, $C_{17}H_{15}NO_4$.

Wie schon hervorgehoben, habe ich früher aschenhaltiges Epinephrin unter den Händen gehabt. Wenn man aber von dem Pikrat ausgeht, erhält man leicht aschenfreie Produkte. Einige Analysen habe ich bereits im Johns Hopkins Hospital, Bulletin für September—October 1898, mitgetheilt. Die Resultate waren folgende:

0,145 g Substanz, in vacuo über Schwefelsäure bei 100° C. getrocknet, gaben 0,3675 g CO_2 und 0,0684 g H_2O , oder 69,12% C. und 5,24% H. Eine zweite Verbrennung von 0,1862 g Substanz, aus einer anderen und etwas modificirten Darstellung herrührend und wie das eben beschriebene Präparat getrocknet, gab 0,473 g CO_2 und 0,0102 g H_2O , oder 69,28% C und 6,09% H. Eine Stickstoff-Bestimmung nach Dumas mit Substanz aus der eben genannten Darstellung ergab folgendes Resultat: 0,1784 g Substanz gaben 7,8 ccm. N bei 21° C. und bei einem Barometerstand von 761 mm. Daher N = 5%.

Gefunden		Berechnet für $C_{17}H_{15}NO_4$
C = 69,12%	69,28%	C = 68,68%
H = 5,24%	6,09%	H = 5,05%
N =	5,00%	N = 4,71%

Epinephrinpikrat, $C_{17}H_{15}NO_4 \cdot C_6H_5(NO_3)_3 \cdot OH$.

Pikrinsäure schlägt das Epinephrin aus seinen Lösungen in verdünnten Mineralsäuren zum grössten Theile nieder. Die Filtrate geben stets noch die Vulpian'sche Reaction mit Eisenchlorid ziemlich intensiv. Die Herstellung des Pikrats geschah in folgender Weise: Das aus der Lösung des gespaltenen Benzoats mit sehr verdünntem Ammoniak gefällte freie Epinephrin

wurde nach dem Waschen wieder in warmer verdünnter Schwefelsäure von 2% gelöst und hierauf durch Zusatz von Natriumpikrat das Pikrat der Base ausgefällt. So erhalten, bildet es eine gelbliche oder bräunliche, harzige Masse. Aus sehr verdünnten Lösungen erhalten, zeigt es eine Tendenz, sich in Büscheln prismatischer Krystalle auszuschcheiden. Nach Waschen mit kaltem Wasser, worin es nur wenig löslich ist, wird es bei 50° C. getrocknet, in Essigäther gelöst (worin es leicht löslich ist) und aus der Lösung durch das 5–6fache Volumen Aethyläther ausgefällt. Das Produkt bildet so ein gelbes, sandiges Pulver, das aus minutiösen Sphärokrystallen besteht. Wenn Aether nur bis zum Eintritt einer Trübung zugesetzt wird, so scheiden sich allmählich an der Wandung der Gefässe sphärische Aggregate wenig gut ausgebildeter Krystalle ab, welche die Grösse eines Stecknadelkopfes besitzen und durch leichten Druck in fächerförmige Fragmente mit radiären Streifen zerfallen. Das Salz ist leicht löslich in Alkohol, Essigäther, Chloroform, Methylal, Acetal und Amylenhydrat, unlöslich oder nur sehr wenig löslich in Aethyläther, Ligroin und Benzol.

Die Versuche, durch Umkrystallisiren aus Wasser zu besser ausgebildeten Krystallen zu gelangen, schlugen fehl; das Produkt war theils amorph, theils in minutiösen Sphärokrystallen wieder ausgefallen. Auf Platinblech erhitzt, verpufft es und brennt mit röthlicher russender Flamme. Mit feingepulvertem Kupferoxyd gemischt, brennt es ruhig ab. Nach wiederholter Fällung aus Essigäther stellt es ein hellgelbes Pulver dar, welches zu folgenden Analysen diente: 0,0492 g hinterliessen im Platintiegel keine Spur von Asche.

Bei der Elementaranalyse wurde ein ziemlich langes Kupferschiffchen verwendet und das Pikrat kalt mit dem Kupferoxyd gemischt (wegen seiner leichten Zersetzlichkeit), worauf wahrscheinlich der etwas zu hohe Wasserstoffgehalt zurückzuführen ist. Die Analysen gaben folgende Resultate:

0,1806 g Substanz bei 110° C. getrocknet gab 0,3496 g CO₂ und 0,0655 g H₂O.

0,2926 g Substanz ebenfalls bei 110° C. getrocknet gab 27 ccm. N bei 20,5° C. und unter einem Barometerdruck von 760,2 mm. gemessen.

Gefunden

C = 52,79 %

H = 4,03 %

N = 10,54 %

Berechnet für $C_{17}H_{15}NO_4 \cdot C_8H_8(NO_2)_3OH$

C = 52,47 %

H = 3,42 %

N = 10,65 %

Ein nicht ganz reines Produkt habe ich erhalten, als ich das am Boden des sich im Autoclaven befindenden Gefässes nach der Spaltung noch vorgefundene harzige Produkt mit warmer 1%iger Schwefelsäure behandelte, die so gewonnene Lösung mit verdünntem Ammoniak fällte und nach dem Waschen rasch wieder in 2%iger Schwefelsäure löste und mit Natriumpikrat fällte. Nach Lösen in Essigäther und Fällen mit Aethyläther diente das Produkt zur Analyse.

0,2098 g bei 110° C. getrocknet lieferten 0,4230 g CO_2 und 0,0768 g H_2O , entsprechend:

C = 54,98 %

H = 4,06 %

Epinephrinbisulfat, $C_{17}H_{15}NO_4 \cdot H_2SO_4$.

Zur Darstellung diente das in beschriebener Weise gereinigte Pikrat, welches in concentrirter Lösung in Essigäther mit absolutem Alkohol, dem etwas verdünnte Schwefelsäure von 25% zugesetzt war, versetzt wurde. Hierbei fällt das Sulfat aus, das im Ueberschuss des sauren Alkohols sich indessen wieder löst. Nun wird eine grosse Menge Aether zugefügt, wodurch das Sulfat als körniges, grauweisses Pulver ausfällt. Wenn jedoch zu viel einer alkoholischen Schwefelsäure angewandt wird, so wird die Ausscheidung durch einen Wassergehalt zähe und ist dann schwerer zu behandeln. Nach Waschen mit Aether, dem etwas absoluter Alkohol zugesetzt wird, löst man es in warmem Alkohol von 95—97% und fällt nochmals mit Aether. Dem Alkohol setzt man behufs rascherer Lösung eine Spur Schwefelsäure zu. Das Produkt ist ziemlich schwer löslich in Wasser, doch empfiehlt es sich nicht, es aus Wasser umzukrystallisiren, da es beim Behandeln mit kochendem Wasser, dem etwas Schwefelsäure zugesetzt ist, sich partiell zersetzt. Wenn man einige Cubikcentimeter des weiter unten beschriebenen wirksamen Sulfats bei mässiger Temperatur einengt und die concentrirte Lösung einige Zeit im Exsiccator

sich selbst überlässt, findet man nach etwa einem Tag die Seiten und den Boden des Gefässes mit einem Netzwerk kleiner hübscher Prismen überzogen. Dieses Salz ist nur mässig beständig, denn nach einigen Wochen bildet sich in der Lösung ein körniger Bodensatz.

Bei 100° C. im Vacuum getrocknet, wurden folgende Zahlen erhalten:

0,0903 g lieferten 0,0533 g BaSO₄.

Gefunden	Berechnet für C ₁₇ H ₁₅ NO ₄ ·H ₂ SO ₄
H ₂ SO ₄ = 24,80 %.	H ₂ SO ₄ = 24,81 %.

Obwohl die bisher beschriebenen Salze wirkungslos waren, da die Bereitungsweise aus der freien Base Umlagerungen nicht ausschliesst, so haben diese Analysen doch wenigstens die Aufstellung der empirischen Formel ermöglicht.

II. Herstellung physiologisch wirksamer Verbindungen des Epinephrins.

Wie oben schon auseinander gesetzt, werden bei der Spaltung der Benzoylverbindung bei Gegenwart von etwas Schwefelsäure unter einem Druck von 3—5 Atmosphären im Autoclaven äusserst wirksame Lösungen von Epinephrin erhalten, welche noch die rosarothte Färbung mit Jodwasser und verdünntem Ammoniak in ausgezeichnete Weise liefern. Nach Entfernung der Benzoesäure wird das Epinephrin direkt als Pikrat ausgefällt durch Zusatz von Natriumpikrat. Wir umgehen somit hier die Isolirung der freien Base, ein Verfahren, welches, wie oben erwähnt, zu inactiven Produkten führen würde. Wenn wir die Herstellung des Niederschlags fractionirt vornehmen, werden die zuletzt erhaltenen Antheile mit einer stickstoffreichen Substanz verunreinigt erhalten. So wurde in einem Fall im ersten Antheil 13,02 % N, in der dritten Fraction aber 16,66 % N gefunden.

Auch die physiologischen Versuche zeigten durch den Einfluss auf den Blutdruck, dass eine verunreinigende Substanz vorhanden ist, besonders in den letzten Fractionen. Bei der Injection dieser letzteren findet man, dass auf das Eintreten des

Steigens des Blutdruckes bald ein deutliches Sinken folgt, was bei den reinen Salzen niemals beobachtet wird.

Die weitere Reinigung des wirksamen Pikrats geschah durch wiederholtes Lösen in Essigäther und Fällern mit Aethyläther, ferner durch Ueberführen in andere Salze.

Ueber die physiologische Wirksamkeit des Pikrats.

Um zu zeigen, wie wirksam das rohe Pikrat ist, will ich die folgenden Versuche erwähnen. Nachdem das rohe Pikrat mit kaltem Wasser gewaschen und in einem Strome 50° C. warmer Luft getrocknet wurde, löste ich es in Essigäther und fällte mit Aethyläther. Hierauf wurde eine Lösung in 45%igem Alkohol von solcher Stärke hergestellt, dass jeder Cubiccentimeter 3,4 mg des Pikrats enthielt. Bei der Injection von 0,35 ccm. dieser Lösung, enthaltend 0,0011 g des Pikrats, in die Jugularvene eines 6850 g wiegenden Hundes mit durchschnittenen Vagi, stieg der Blutdruck sofort von 102 auf 148 mm. Quecksilber. Bei einem zweiten Versuch, bei welchem 0,0042 g des rohen Pikrats in die Jugularvene eines 6850 g wiegenden Hundes mit durchschnittenen Vagi injicirt wurden, stieg der Blutdruck von 122 auf 210 mm. Quecksilber. Bei diesem Versuche wurde die alkoholische Lösung des Pikrats vor der Injection mit Wasser soweit verdünnt, dass sie nur noch 15% Alkohol enthielt. Hierbei wurde etwas Pikrat in Form einer Trübung ausgefällt. Das so injicirte Pikrat führte zu folgendem bemerkenswerthen Resultat: Der Blutdruck blieb ungefähr zehn Minuten lang auf dem hohen Stande und erst nach fünfzehn Minuten war der Druck wieder normal geworden, aber niemals wurde hier das geringste Anzeichen eines weiteren Sinkens unter den normalen Druck wahrgenommen. Wie wir später sehen werden, ist aber hier keineswegs noch die volle Wirkung des Epinephrins hervorgetreten, denn die leichter in Wasser löslichen Salze wie das Bisulfat und speciell das Hydrochlorat entwickeln eine ganz überraschende Fähigkeit, schon in sehr kleinen Dosen den Blutdruck zu erhöhen.

Analytische Daten für das wirksame rohe Pikrat.

0,1618 g des erst injicirten Pikrats, im Vacuumexsiccator bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, lieferten 0,2974 g CO_2 und 0,0585 g H_2O , entsprechend: C = 50,13%,

H = 4,02%.

0,1840 g lieferten 23,8 ccm. N bei 16,5° C. und unter einem Barometerdruck von 769,2 mm. gemessen, entsprechend: N = 15,22%.

In einem zweiten Fall wurde das rohe Pikrat nicht erst durch fractionirte Fällung gereinigt, sondern direkt in das Bisulfat verwandelt, und aus diesem wurde dann wieder das Pikrat hergestellt.

0,1863 g dieses Pikrats lieferten 0,3787 g CO_2 und 0,0635 g H_2O , entsprechend: C = 55,43%,

H = 3,78%.

0,1720 g lieferten 20 ccm. N bei 25,5° C. und unter einem Barometerdruck von 765 mm. gemessen, entsprechend: N = 13,02%.

Auch in diesem Falle hat sich das Pikrat als höchst wirksam erwiesen. Aus den mitgetheilten Analysen folgt, dass das wirksame Pikrat noch mit verschiedenen Substanzen verunreinigt ist. Um nun noch reinere Produkte zu erhalten, habe ich bei meinen neuesten Versuchen, um den Prozentsatz der fremden Benzoate zu vermeiden, nur sehr verdünnte Extracte der Drüsen verwendet. Es ist ferner klar, dass beim Ausgehen von einem unreinen Pikrat behufs Darstellung anderer Salze die meisten Verunreinigungen entfernt werden können. Ich habe deshalb den Versuch aufgegeben, das active Pikrat als solches weiter zu reinigen, sondern habe meine Aufmerksamkeit auf die Herstellung anderer activer Salze aus dem Pikrat gerichtet, wozu das Pikrat vorzüglich geeignet ist. Hierbei müssen wässrige Lösungen vermieden werden.

Wirksames Bisulfat.

Das active Bisulfat wird in ziemlicher Reinheit in der folgenden Weise erhalten. Man löst das Pikrat in Essigäther, versetzt mit alkoholischer Schwefelsäure und fällt es fractionirt mit dem 4—6 fachen Volumen Aethyläther. Nach gründlichem Waschen mit einer Mischung von Alkohol und Aether wird diese erste Fraction in warmem Alkohol von 95% gelöst.

filtrirt und das Filtrat mit Aether wieder gefällt, wobei man wieder nur die erste und grössere Fraction in Betracht zieht. Man operirt dabei so rasch, dass die Absorption von Wasser aus der Alkohol-Aetherlösung seitens des Niederschlags vermieden wird. Es wird dann ein staubartiges, aschefreies, fast weisses und in heissem Wasser ziemlich lösliches Pulver erhalten, welches physiologisch sehr wirksam ist und sich in trockenem Zustand beliebige Zeit aufbewahren lässt.

Die Analysen dieses Salzes gaben folgende Resultate:

0,0888 g im Platintiegel verbrannt lieferten keine Spur von Asche. Der Tiegel hatte dasselbe Gewicht wie zuvor.

Beim Erhitzen blähte sich das Salz, entwickelte widrigriechende Gase und hinterliess eine Menge von mässig schwer verbrennlichem Kohlenstoff. In seinem Verhalten bei der Verbrennung im Tiegel erinnert das Epinephrin sehr an Alkaloide wie das Morphin. 0,2390 g im Vacuumexsiccator getrocknet und im Bleichromatrohr mit vorgelegter reducirter Kupferspirale verbrannt, lieferten 0,4548 g CO_2 und 0,1124 g H_2O , entsprechend: C = 51,89%, H = 5,23%, 0,2278 g im gewöhnlichen Luftbad während 5 Stunden bei 110° C. getrocknet und wie eben beschrieben verbrannt, lieferten 0,4426 g CO_2 und 0,1038 g H_2O , entsprechend C = 52,98 H = 5,06.

0,1800 g des Salzes, bei 110° getrocknet, lieferten nach Liebig 0,0970 g BaSO_4 , entsprechend 22,66% Schwefelsäure.

Gefunden,	Gefunden,	Berechnet für
im Vacuum getrocknet bei 110° C.	getrocknet	$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$
I	II	
C = 51,89%	C = 52,98%	C = 51,64%
H = 5,23%	H = 5,06%	H = 4,30%
H_2SO_4 =	22,66%	H_2SO_4 = 24,81%

Es geht hieraus hervor, dass dieses wirksame Salz noch nicht ganz rein ist; denn die Zahlen für C und H sind etwas zu hoch, besonders bei der bei 110° C. getrockneten Probe, was auf einen schädigenden Einfluss dieser hohen Temperatur deuten könnte. Die Schwefelsäurebestimmung der ebenfalls bei dieser Temperatur getrockneten Probe gab auch eine zu niedrige Zahl. Immerhin ist die Abweichung nur gering und die früher aus der freien Base abgeleitete Formel kann als bestätigt gelten. Ich werde weiterhin zeigen, dass diese Formel sich aus manchen Derivaten wie die Acetylverbindung ergibt.

Die zweite Fraction des Sulfats, erhalten von späteren

Fractionen des Pikrats, enthält mehr Kohlenstoff und weniger Schwefelsäure als das eben beschriebene Salz. Sie wurde in Alkohol gelöst, dem eine Spur Schwefelsäure zugesetzt war, und mit Aether gefällt. Im Vacuum bei 110° C. getrocknet, lieferte es 56,22% C, 5,20% H und 22,29% H_2SO_4 . Die Existenz eines neutralen Sulfats muss wohl ebenfalls in Betracht gezogen werden, welches C = 58,95%, H = 4,61 und H_2SO_4 = 14,17% verlangen würde. Es ist recht wohl möglich, dass unter veränderten Bedingungen, besonders bei anderem Wasser und Schwefelsäuregehalt der Lösungen, ein Gemisch beider Sulfate niedergeschlagen werden könnte.

Es wurde nur ein Versuch gemacht, das neutrale Sulfat $(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ darzustellen. Es wurden hierbei die späteren Fractionen von schwefelsäurearmen Lösungen, denen ein grosser Ueberschuss von Aether zugesetzt war. Das Material reichte leider zu einer vollständigen Analyse nicht aus, aber die Schwefelsäurebestimmung spricht zu Gunsten meiner Ansicht. 0,1584 g dieses Sulfats lieferte 0,057 g BaSO_4 = 15,13% Schwefelsäure, während die Formel $(\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4)_2\text{H}_2\text{SO}_4$, wie eben angegeben, H_2SO_4 = 14,17% verlangt.

Epinephrin-Hydrochlorat und -Hydrobromat.

Ausserordentlich leicht lösliche Salze sind das chlor- und bromwasserstoffsäure Salz, erhalten aus der Lösung des Pikrats in Essigaether durch Versetzen mit alkoholischer Lösung von HCl resp. HBr. (Das HJ-Salz wurde noch nicht darzustellen versucht.) Diese Salze sind grau bis braun, je nach dem Zustande der Reinheit. Sie werden gereinigt durch Wiederlösen in absolutem Alkohol und Auffangen des Filtrats in viel Aether. Die alkoholischen Lösungen färben sich rasch dunkel. Wegen ihrer leichten Löslichkeit dürften sie besonders zu therapeutischen Zwecken geeignet sein. Eine Probe des HBr-Salzes, aus einer dritten Fraction des Pikrats hergestellt, wurde im Vacuum getrocknet und mit dem folgenden Resultat analysirt: 0,2149 g gaben 0,1029 g HBr = 20,62% HBr.

Verlangt für $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4$. HBr: 21,42% HBr.

Das Hydrochlorat wurde für physiologische und chemische

Versuche verwendet, welche weiter unten beschrieben werden. Eine kleine Menge diente zur Herstellung des Chloroplatinats, welches aber sehr rasch dunkelt und sich verändert, so dass die Analyse nicht verlässlich ist. Nochmals in heissem Alkohol gelöst und in viel Aether filtrirt, fiel es in braunen Flocken aus, welche nach Waschen mit Alkoholäther und schliesslich mit Aether analysirt wurden. Der flockige Niederschlag enthielt 10,13 % Pt.

Ueber Triacetylepinephrin.

Diese Verbindung bildete sich bei dreistündigem Kochen von Epinephrinbisulfat (0,7 g) mit einem Ueberschuss von Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumacetat am Rückflusskühler. Bei nachheriger Behandlung mit Wasser schied sich die Triacetylverbindung als harzige Masse aus. Diese wurde nach dem Waschen in Chloroform gelöst und das Filtrat in Petroleumäther aufgefangen, wobei sich das Produkt in Flocken und Körnchen ausschied, welche Reinigungsmethode nochmals wiederholt wird. Es bildet nun ein fast weisses, nicht krystallinisches, staubartiges Pulver. Die Ausbeute betrug von obengenannter Menge Bisulfat = 0,34 g. Der bei der Wasserbehandlung des Reactionsproduktes in Lösung gebliebene Antheil kann durch Ausschütteln mit Chloroform ganz gewonnen werden.

Analyse.

0,1612 g bei 80° C. über H_2SO_4 im Vacuum getrocknet, lieferten 0,3829 g CO_2 und 0,0693 g H_2O .

Gefunden	Berechnet für $C_{17}H_{19}NO_4 (CO.CH_3)_3$
C = 64,78 %	C = 65,24 %
H = 4,81 %	H = 4,96 %

Ich stellte nun eine grössere Menge des Acetylderivats dar und zwar diesmal aus einem Bisulfat, welches aus dem mit Essigäther aus der ursprünglichen Pikratmutterlauge ausgeschüttelten Pikrat erhalten worden war. 3,83 g dieses Bisulfats lieferten bei der Wasserbehandlung nach der Acetylierung als harzige Fällung = 1,14 g des Triacetylprodukts und ferner noch 2,99 g beim Ausschütteln dieser Mutterlaugen mit Chloro-

form. Zu den Mutterlaugen wurden aber die Mutterlaugen aus der ersten, sowie noch jene aus einer zweiten Probedarstellung hinzugefügt. Aus Obigem ist ersichtlich, dass die Ausbeute des Acetylderivats eine sehr gute ist.

Eine vollständige Analyse wurde von dem erwähnten, mit Chloroform ausgeschüttelten Produkt ausgeführt.

0.1628 g, im Vacuumexsiccator getrocknet, lieferten 0,3823 g CO_2 und 0,0766 g H_2O . entsprechend $\text{C} = 64,04\%$ und $\text{H} = 5,22\%$.

0,3652 g, in gleicher Weise getrocknet, lieferten nach Dumas 12,8 ccm. N bei $21,5^\circ \text{C}$ und unter einem Barometerdruck von 762 mm. gemessen, entsprechend $\text{N} = 3,99\%$.

0,2985 g bei 100°C . im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. lieferten 9,5 ccm. N bei $21,5^\circ \text{C}$ und bei einem Barometerstand von 762 mm. gemessen, entsprechend $\text{N} = 3,62\%$.

0,2835 g, im Vacuumexsiccator während mehrerer Wochen getrocknet, lieferten nach der Verseifung mittelst der weiter unten beschriebenen Methoden 0,12053 g Essigsäure, entsprechend 0,0864 g Acetyl = $30,47\%$ Acetyl.

0,3631 g, bei 100° in Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. lieferten, nach der gleichen Methode verseift, 0,1524 g Essigsäure, entsprechend 0,10922 g Acetyl = $30,08\%$ Acetyl.

Gefunden für das ausgefällte Acetylprodukt	Gefunden für das mit Chloroform ausgeschüttelte Derivat	Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_4 (\text{CO}_2\text{CH}_3)$
$\text{C} = 64,78\%$	$\text{C} = 64,04\%$	$\text{C} = 65,24\%$
$\text{H} = 4,81\%$	$\text{H} = 5,22\%$	$\text{H} = 4,96\%$
	$\text{N} = 3,62\%$ (bei 100°C . getrocknet)	$\text{N} = 3,31\%$
	$\text{N} = 3,99\%$	$\text{C}_4\text{H}_5\text{O} = 30,50\%$
	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O} = 30,47\%$	
	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O} = 30,08\%$ (bei 100°C . getrocknet).	

Aus den Analysen ist ersichtlich, dass das mit Chloroform ausgeschüttelte Produkt für Kohlenstoff etwas zu niedrige Zahlen aufweist. Das diesem entsprechende ausgefällte Acetylderivat war leider bei zu hoher Temperatur getrocknet und gab bei der Analyse $\text{C} = 63,45\%$, $\text{H} = 5,06$. Das Minus an Kohlenstoff ist bei diesem Antheil unzweifelhaft auf eine durch das Trocknen herbeigeführte geringe Zersetzung¹⁾ zurückzuführen.

1) Im Gehalt an Stickstoff, Wasserstoff und Acetyl sind die durch zu scharfes Trocknen verursachten Schwankungen geringer, aber immerhin noch bemerkbar.

Folgende Resultate sollen diese Meinung erhärten. Während eine bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Probe des mit Chloroform ausgeschüttelten Produktes, wie oben angegeben, 64,04% C und 5,22% H lieferte, gab dieses Produkt bei 100° 6—8 Stunden erwärmt (wobei Bräunung eintritt) 62,62% — 61,55% C und 4,91 — 5,18% H. Gewichtsconstanz wird zwar bei 100° erhalten, aber, wie erwähnt, erst nach einer gewissen Veränderung. Beim Trocknen sollte 80° nicht überschritten werden.

Das Triacetylderivat ist bis jetzt das am reinsten erhaltene active Derivat. Es wird, wie erwähnt, aus der Benzoylverbindung, welche zuerst in das Pikrat und dann in das Bisulfat verwandelt wird, erhalten. Erst dann, wenn durch diese Umwandlungen Unreinigkeiten entfernt sind, schreitet man zur Darstellung der Triacetylverbindung. Ob wir daraus sicher auf drei Hydroxylgruppen schliessen dürfen, müssen weitere Studien über die in dem Epinephrin enthaltenen Atomgruppen entscheiden.

Ueber das für Bestimmung der Acetylgruppen eingeschlagene Verfahren.

Die Acetylverbindung wird leicht durch verdünnte Alkalien angegriffen. Ich wandte eine 5%ige Lösung von Aetznatron an, womit ich die Verbindung zuerst gelinde bis zur Lösung erwärmte und dann noch 15 Minuten kochte. Die Mischung nimmt dabei eine dunkelbraune Farbe und einen an Coniin und Piperidin erinnernden Geruch an, genau wie bei den Salzen des Epinephrins, wenn sie in alkalischer Lösung erwärmt werden. Die Mischung wurde nach dem Erkalten mit Phosphorsäure¹⁾ versetzt und in üblicher Weise vorsichtig destillirt. Die Vorlage enthielt 18—20 ccm. einer ca. $\frac{N}{5}$ Kalilösung. Der Kolben wurde zuletzt in ein Oelbad von 160 bis 180° C. gesetzt, dann nochmals nach Zusatz von etwas

¹⁾ Bei dem Phosphorsäurezusatz entsteht ein dunkelbrauner, melaninartiger Niederschlag, auf den ich später zurückkommen werde.

Wasser erhitzt, was dreimal wiederholt wurde, um die letzten Spuren Essigsäure überzudestilliren.

Die Kalilösung in der Vorlage wurde nun mit Schwefelsäure titirt, von der 1 ccm. = 0,01618 BaSO₄ = 0,00833 Essigsäure entsprach, unter Benutzung von Lakmus als Indicator. Die schwach sauer reagirende Flüssigkeit wurde schliesslich am Rückflusskühler gekocht, bis alle aus dem Aetznatron oder der organischen Substanz stammende CO₂ entfernt war, und mit der titirten Kalilösung (1 ccm. = 0,01313 g. Essigsäure) zurücktitirt. Selbstverständlich wurden noch Kontrollversuche ausgeführt, welche die absolute Reinheit der Reagentien darthaten. Nur etwas CO₂ wurde erhalten. Weitere Versuche mit 0,15 g Epinephrinbisulfat bewiesen mir, dass bei der Behandlung von Epinephrin selbst mit Natronlauge und Phosphorsäure keine flüchtige, organische Säure, sondern nur etwas CO₂ entsteht. Ferner habe ich mich überzeugt, dass kein Verlust beim Kochen von verdünnter Essigsäure am Rückflusskühler entsteht.

Ist das Epinephrin, wie v. Fürth annimmt, ein Hydrodioxyppyridin?

Es mag hier am Platze sein, das von O. v. Fürth¹⁾ aus dem blutdrucksteigernden Körper der Nebenniere erhaltene Acetylderivat einer Betrachtung zu unterziehen. Die zweite Abhandlung dieses Autors wurde ungefähr um dieselbe Zeit veröffentlicht, als meine zweite Abhandlung erschien, und ich hatte bis jetzt keine Gelegenheit, auf jene Resultate zurückzukommen. Jenes Acetylprodukt war die einzige Verbindung, welche v. Fürth in Händen hatte, und dieselbe war erhalten worden durch Acetylierung von Produkten, welche entweder vorher einer Reduction mit Zink und Schwefelsäure unterworfen oder aus dem Organ durch verdünnte Zinksulfatlösung extrahirt waren. Keine zwei Proben des Acetylprodukts, aus verschiedenen Mengen der Drüse stammend, stimmten in ihrer Elementarzusammensetzung überein. Der C-Gehalt schwankte von 51,53—59,70%, der H-Gehalt von 5,18—6,58% und der

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 15.

Stickstoff von 4,80—6,20 %. Aus dem gewonnenen Mittel berechnet v. Fürth, dass das von ihm analysirte Produkt das Triacetylderivat des Tetrahydrodioxypyridins oder Dihydrodioxypyridins, $C_5H_9NO_3$ oder $C_5H_7NO_2$, ist.

Die analytischen Resultate welche mir, nach mehrfachen reinigenden Procedures des Epinephrins, die Acetylverbindung lieferte, sind weit verschieden von denen des Herrn v. Fürth, der C-Gehalt ist höher und der N-Gehalt niedriger als v. Fürth annimmt. Der grosse Unterschied unserer Resultate ergibt sich schon aus den verschiedenen Mengen Essigsäure, welche aus dem Acetylprodukt abgespalten wurden. So fand v. Fürth 64,43—69,62 % Essigsäure, während ich 42,51 bis 43,11 % fand. Bei Annahme von v. Fürth's Formeln würden 74,69 oder 75,31 % Essigsäure erfordert werden, während meine Formel 42,55 % verlangt, also weit besser mit der Beobachtung stimmt. Es kann kaum einem Zweifel unterliegen, dass das von v. Fürth analysirte Produkt ein Gemenge von Epinephrin mit andern Substanzen war. Nur die Isolirung einer Anzahl von Salzen und andern Derivaten kann hier die Sicherheit der Reinheit geben und zu einer zuverlässigen Formel führen.

Phenylhydrazin und Epinephrin.

Ich habe vor Kurzem beobachtet, dass die Acetylverbindung des Epinephrins bei entsprechender Behandlung mit Phenylhydrazinacetat ein Phenylhydrazinderivat liefert. Das Produkt besitzt noch basische Eigenschaften und lässt sich als Pikrat ausfällen, in ein Sulfat u. s. w. verwandeln. Aus dem Sulfat fällt bei genauer Neutralisation mit verdünntem Ammoniak ein flockiges Epinephrinhydrazon aus, welches sich aber in seinen Eigenschaften scharf von Epinephrin selbst unterscheidet. So gibt es eine hübsche Rosafärbung bei Zusatz von Jodwasser und Ammoniak, aber diese verschwindet nicht beim Kochen, sondern tritt noch besser hervor. Ferner erfolgt beim Kochen mit schwachen Alkalien (bis zu 25 % NaOH) nicht eine braune oder braun-schwarze Färbung, sondern eine schöne Rosafärbung, welche bei stärkeren Lösungen in eine tiefe blau-violette Färbung

übergeht und welche längere Zeit bestehen bleibt. Concentrirte H_2SO_4 löst es mit carminrother Farbe auf, concentrirte HCl mit weinrother Farbe. Die Reaction mit $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{KMnO}_4$ bleibt erhalten und die mit dem Mandelin'schen Reagens zeigt das Stadium der blassrothen Färbung in deutlicherer Weise als das Epinephrin selbst. Fehling's Lösung wird beim Stehen mit der Verbindung nicht reducirt, wohl aber beim Kochen nach vorheriger Spaltung des Hydrazons mit Alkalien oder Säuren.

In diesem Phenylhydrazinderivat sind die Acetylgruppen, wie es scheint, nicht mehr enthalten. Ich habe jedoch Gründe für die Annahme, dass auch bei Beibehaltung der Acetylgruppen ein Hydrazon zu erhalten ist.

Es unterliegt also kaum einem Zweifel, dass eines der Sauerstoffatome des Epinephrins den Charakter eines Aldehyds oder Ketonsauerstoffs besitzt. Ich hoffe, später Weiteres mittheilen zu können, wenn die vermuthete Keton- respective Aldehydnatur durch weitere Gruppenreactionen begründet worden ist.

Vergleichende physiologische Versuche mit Proben wirksamen Bisulfats, dargestellt aus den Filtraten von den mit Natriumpikrat erhaltenen Niederschlägen.

Ich habe oben bereits mitgetheilt, dass nach Zersetzung des Benzoylprodukts und Entfernung der Benzoesäure Natriumpikrat im Ueberschuss zwar Epinephrinpikrat fällt, aber doch noch erheblich Epinephrin gelöst bleibt, denn das Filtrat gibt noch starke Reactionen auf die Base und ist physiologisch noch äusserst wirksam. Essigäther entzieht beim Schütteln das wirksame Pikrat der Lösung. Das hieraus dann dargestellte Bisulfat stimmt mit dem früher beschriebenen, aus dem direkt gefällten Pikrat dargestellten völlig überein, ja ich schloss aus der übergrossen Wirksamkeit, dass jenes Sulfat noch reiner ist als dieses.

Dieses veranlasste mich, jenes Bisulfat dazu zu verwenden, den Minimumbetrag zu finden, der den Blutdruck noch zu steigern im Stande sei. Diese Versuche sind folgende: Von

einer Probe dieses Bisulfats reichten 0,00013 g hin, den Blutdruck um 14 mm. Hg zu erhöhen bei einem kleinen Hunde mit durchschnittenen Vagi. Auch von einer zweiten Probe reichte eine sehr geringe Dosis hin, doch hinderte ein Unfall die genauere Bestimmung. Von einem dritten Präparat waren nur 0,00011 g nöthig, den arteriellen Blutdruck um 16 mm. zu erhöhen bei einem 6,08 kg. wiegenden Hunde. Bei einer Injection von 0,00043 g dieses Präparats stieg der Blutdruck unmittelbar um 60 mm. Es ist somit klar, dass noch eine entschiedene physiologische Wirkung von einer so geringen Menge als 0,000018 g pro Kilo Körpergewicht vom Bisulfat hervorgerufen werden kann, entsprechend 0,000013 g der freien Base. Bei Injection des 5—6fachen Betrags erfolgte eine sehr bedeutende und langanhaltende Blutdrucksteigerung. Bei diesen Versuchen wurde mit einer genau calibrierten Spritze in die Jugularvene injicirt; die benutzten Lösungen enthielten 0,001 g pro Cubikcentimeter.

Da die verschiedenen Proben des eben beschriebenen, aus den Filtraten von der Natriumpikratfällung gewonnenen Bisulfats nicht völlig in Bezug auf den Schwefelsäuregehalt stimmten, dürfte wohl in einem oder anderen Falle noch eine geringe Verunreinigung enthalten sein. Auch ist der Schwefelsäuregehalt dieses sehr wirksamen Salzes immer noch etwas niedriger gefunden worden, als von meiner Formel verlangt wird. Die erhaltenen Resultate waren wie folgt:

0,177 g des im ersten der eben beschriebenen physiologischen Versuche benutzten Bisulfats wurden in verdünnter, heisser Salzsäure gelöst und die Schwefelsäure direkt mit BaCl_2 ausgefällt. BaSO_4 erhalten = 0,0935 g, entsprechend H_2SO_4 = 22,21%.

0,0838 g des im zweiten physiologischen Versuche angewandten Präparats lieferten 0,0456 g BaSO_4 ,¹⁾ entsprechend 22,88% H_2SO_4 .

0,2402 g des im dritten physiologischen Versuche angewandten Präparats lieferten 0,1347 g BaSO_4 , entsprechend H_2SO_4 = 23,58%.

0,1824 g dieses Präparats, bei 110° C. im Trockenschrank getrocknet, lieferten 0,3205 g CO_2 und 0,0815 g H_2O .

1) Diese und die folgende Analyse wurden nach Liebig ausgeführt, weil das Bisulfat, wie alle Salze des Epinephrins, mit der Zeit an Löslichkeit einbüsst.

Gefunden	Verlangt für $C_{17}H_{15}NO_4 \cdot H_2SO_4$	Verlangt für $(C_{17}H_{15}NO_4 \cdot H_2SO_4) + 1\frac{1}{2} H_2O$
C = 47.92 %	C = 51.64 %	C = 48.34 %
H = 4.90 %	H = 4.30 %	H = 4.74 %

Manches spricht dafür, dass dieses das reinste sämmtlicher dargestellter Salze ist und dass wir anzunehmen haben, dass unter anderem das wirksame sich von dem unwirksamen Präparat dadurch unterscheidet, dass jenes ein, respectiv ein und einhalb Molekül Wasser mehr enthält. Bei dieser Annahme ($1\frac{1}{2} H_2O$ mehr) würde das reine Bisulfat 48,34% C, 4,74% H und 23,22% H_2SO_4 verlangen. Diese Vermuthung würde durch die analytischen Resultate des Acetylproductes keine Widerlegung erfahren, da ja bei der Acetylverbindung das supponirte Wasser eingebüsst werden könnte. Hierbei mag auch auf die Thatsache hingedeutet werden, dass man auf dreierlei verschiedenen Wegen ein Bisulfat darzustellen vermag, welches immer genau die nämlichen Reactionen zeigt und eine sehr annähernd gleiche Zusammensetzung aufweist. Auch führt das Bisulfat, auf welche Weise es auch dargestellt wird, anscheinend immer zu dem gleichen Acetylproduct.

Farben-Alkaloidreactionen der Epinephrinsalze.

Beide, die Salze der wirksamen und der unwirksamen Modification des Epinephrins, verhalten sich charakteristisch gegen die gewöhnlichen, durch Erzeugung von Färbungen ausgezeichneten Alkaloidreagentien. Die feinste Reaction ist die des Mandelin'schen Reagens, welches selbst bei leisen Spuren von Epinephrin dunkelstahlblaue Streifen hervorruft, an denen ein rasches und feines Farbenspiel von rasch verschwindendem Violett zu Kirschroth und Rosa stattfindet. Wenn jenes Reagens mit 5—6 Theilen H_2O verdünnt angewendet wird, bringt es beim Eintröpfeln in eine Epinephrinsalz-Lösung eine schöne violette Färbung hervor, die bald blassroth wird und dann sogleich verschwindet, bei jedem Tropfen der in die Lösung fällt.

Concentrirte Schwefelsäure löst Epinephrin und seine Salze auf und ruft eine oliven- bis schmutzig braun-grüne Färbung hervor. Wird in jene Lösung ein Körnchen $KMnO_4$,

gegeben, so entsteht eine schöne bläulich-violette Färbung, welche bald einen mehr indigoblauen Ton annimmt und lange unverändert fort besteht. Von der ähnlichen Reaction beim Strychnin unterscheidet sie sich dadurch, dass die Reihe der intermediären Uebergänge nicht beobachtet wird. H_2SO_4 mit MnO_2 oder H_2SO_4 mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ geben ein ähnliches rasches, aber weniger deutliches Farbenspiel, wie Mandelin's Reagens. Fröhde's Reagens, H_2SO_4 + Rohrzucker, concentrirte oder rauchende HNO_3 geben keine farbige Reaction.

Verhalten zu alkaloidfällenden Reagentien.

Zu diesen Versuchen dienten lediglich die wirksamen Salze, welche eine eminent reducirende Kraft (an die der Amidoaldehyde erinnernd) besitzen, was dadurch illustriert wird, dass aus Jodsäure Jod, aus ammoniakalischer Silberlösung Ag abgeschieden wird und K-Ferricyanid zu K-Ferrocyanid reducirt wird; auch PtCl_4 und AuCl_3 werden reducirt, wenn auch langsamer. Fehling's Lösung liefert keine Abscheidung von Cu_2O .

Die in der folgenden Tabelle beschriebenen Niederschläge wurden meistens in verdünnten Lösungen erhalten, welche in ihrer Concentration, schätzungsweise, zwischen $\frac{1}{100}$ bis $\frac{1}{500}$ schwankten.

Reagentien	Eigenschaften des Niederschlags
Jodjodkalium	Brauner, flockiger Niederschlag, Amorph.
Kaliumcadmiumjodid	Weisser, „ „ „
Kaliumquecksilberjodid	„ „ „
Jodchlorid und Jodtrichlorid	Brauner oder gelblich brauner, flockiger, bald sich zu einem käsigen Niederschlag umformend. Amorph.
Kupferacetat	Grünlich-weisser, flockiger Niederschlag, Amorph.
Pikrinsäure	Gelber, flockiger Niederschlag. Fällung nicht vollständig.
Concentrirte Lösung Sulfo- cyanammonium	Weisser, flockiger Niederschlag, löst sich auf Zusatz von Wasser. Amorph.
Concentrirte Zinkchlorid- Lösung	Weisser flockiger Niederschlag. Amorph.

Reagentien	Eigenschaften des Niederschlags
Platinchlorid (10%ige wässrige Lösung)	Gelber, flockiger, amorpher Niederschlag. in Alkohol löslich, wird rasch dunkel gefärbt, reducirt sich beim Stehen, unter Ausscheidung von Pt.
Goldchlorid (10%ige wässrige Lösung)	Verhält sich wie der eben beschriebene Niederschlag.
Phosphormolybdänsäure	Weisser, flockiger, amorpher Niederschlag.
Phosphorwolframsäure	„ „ „ „ „ „
Gerbsäure	Weisser, flockiger, amorpher Niederschlag aus concentrirten Lösungen.
Quecksilberchlorid (gesätt. wässrige Lösung)	Kein Niederschlag aus verdünnten Lösungen.
Quecksilbercyanid (idem)	„ „ „ „ „ „
Kaliumbichromat (gesätt. Lösung)	Brauner, flockiger, amorpher Niederschlag.
Kaliumferrocyanid (idem)	Weisser, „ „ „ „ „ „
Einleiten von Chlor oder Brom	Flockiger, bald käsiger werdender Niederschlag.

Ueber die Zersetzungsprodukte des Epinephrins bei Behandlung mit Alkalien.

Wir haben bereits die leichte Veränderlichkeit des Epinephrins unter verschiedenen Einflüssen erwiesen. Diese ist sogar noch bedeutender, als es nach meinen ersten Versuchen den Anschein hatte. Wenn wir in Betracht ziehen, welche geringe Mengen hinreichen, die physiologische Reaction auf den Blutdruck zu erzeugen, dürfen wir uns aber nicht darüber wundern, dass nach schädigender Einwirkung einer 5%igen Natriumhydratlösung¹⁾ auf wirksame Salze eine auf diese Weise noch auffindbare Menge der Veränderung entging.

Meine weiteren Studien über die wirksamen Salze haben mich ferner überzeugt, dass die carminrothe Substanz, welche aus den wirksamen Salzen unter Einfluss von sehr verdünntem Alkali und gelinder Oxydation (Jodwasser und NH_3) mit dem Epinephrin in inniger Beziehung steht, und nicht etwa bloss

¹⁾ Johns Hopkins Hospital Bulletin, July 1897.

einer Verunreinigung zuzuschreiben ist, wie ich in meiner ersten Abhandlung vermuthungsweise äusserte. Dieser rothe Körper nimmt bei Anwesenheit stärkerer Alkalien sehr rasch eine braune oder schwarze Färbung an. Diesen braunen Farbstoff habe ich näher untersucht.

Das beim Verseifen des Benzoylderivats im Autoclaven ohne Schwefelsäurezusatz erhaltene Produkt unterliegt bald einer Oxydation und nach einigen Wochen ist ein beträchtliches Sediment eines braunschwarzen Pigments gebildet. Lösungen des Epinephrins in organischen Säuren verhalten sich ebenso. Das Filtrat gibt dann weder chemische, noch physiologische Reactionen des Epinephrins. Eisenchlorid gibt dann keine grüne Färbung mehr, der Blutdruck wird nicht mehr erhöht.

Ein scheinbar damit identisches Produkt wird erhalten, wenn immer Lösungen des Epinephrins mit Alkaliüberschuss gekocht und mit Mineral- oder Essigsäure gefällt werden. Bei der Bestimmung der Acetylgruppen haben wir diese Beobachtung bereits gemacht und oben mitgetheilt. Das Pigment ist leicht in verdünnten Alkalien löslich und hat im allgemeinen Verhalten manche Aehnlichkeiten mit den von verschiedenen Forschern aus thierischen Organen isolirten Melaninen. Wegen seiner sauren Natur nenne ich das Produkt Epinephrinsäure. Wenn es durch Behandeln des salzsauren Epinephrins mit Natronlauge von 25% gebildet und mit Schwefelsäure daraus niedergeschlagen wird, erhält es nach Waschen und Trocknen noch immer Stickstoff. Mit der Analyse bin ich noch beschäftigt, Mittheilung der Resultate wird folgen. Soweit bis jetzt ersichtlich ist, ist dieser Körper das Hauptumwandlungsprodukt.

Ein zweites Zersetzungsprodukt unter dem Einfluss von Alkalien ist von basischem Charakter. Eine mit Alkali übersättigte Lösung eines Epinephrinsalzes entwickelt schon bei gewöhnlicher Temperatur einen Geruch, der an den eines Gemisches von Coniin und Piperidin erinnert. Die Base, deren Dämpfe stark alkalisch auf Lakmus reagieren, kann zum kleinen Theil mit Aether ausgeschüttelt werden. Diese ätherische Lösung gibt Nebel mit HCl-Gas und mit Salzsäure sofort einen Niederschlag eines HCl-Salzes. Beim Verdunsten der mit HCl

versetzten ätherischen Lösung hinterbleibt das HCl-Salz der Base in Form weisser harziger Kügelchen. Dieses Salz, in Wasser gelöst, gibt auf Zusatz von Alkali eine Ausscheidung von öligen Tropfen von dem ursprünglichen Geruch.

Jodkaliumquecksilber, Jodkaliumcadmium, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure und Tannin geben alle weisse flockige Niederschläge mit dem HCl-Salz. Platinchlorid gibt einen gelben käsigen Niederschlag, während Jodjodkalium rothbraune Flocken liefert. Andere Alkaloidreagentien wurden noch nicht versucht. Beim Schmelzen mit Zinkstaub entwickelt das HCl-Salz einen starken Pyrrolgeruch und die Fichtenspahnreaction wird in ausgezeichneter Weise erhalten.

Ob das basische Produkt einheitlich ist, oder aus mehreren Basen besteht, ist noch nicht entschieden: denn die Reindarstellung der basischen Bestandtheile ist mit Schwierigkeiten verbunden, indem schon die Destillation einen weiten zersetzenden Einfluss zu haben scheint. Ich zweifle deshalb, ob ich die basische Substanz frei von anderen Zersetzungsprodukten des Epinephrins erhalten habe. Soweit die Sache jetzt beurtheilt werden kann, sind die beiden Hauptprodukte der Epinephrinspaltung vermitteltst Lösungen von Alkalien, eine Säure und eine (eventuell mehrere) Base, in welcher Beziehung das Epinephrin mit vielen Pflanzenalkaloiden übereinstimmt. Weitere Mittheilungen hoffe ich später machen zu können.

Ueber die Zersetzungsprodukte des Epinephrins bei trockener Destillation und Destillation mit Zinkstaub.

Versuche, über welche ich schon in meiner ersten Abhandlung berichtet habe, hatten bereits ergeben, dass das Epinephrin bei trockener Destillation unter Anderem Pyrrol und Amine liefert, dass es sich also in dieser Beziehung wie viele Alkaloide verhält. Beim Schmelzen des Epinephrins mit Zinkstaub in einem Strome trocknen Wasserstoffs und Aufangen der Produkte in einer Reihe kleiner Flaschen beobachtete ich ausser Aminen und Pyrrol eine Substanz vom Geruche des Benzaldehyds und ferner eine, deren Lösungen eine rosa-rothe Färbung an der Luft annahmen und weitere noch nicht

näher studirte Produkte. Ob Pyridin unter diesen war, konnte ich nicht sicher darthun, obgleich ich einen Niederschlag mit Bromwasser und mit Kupfersulfat erhielt. Die schön blaue charakteristische Färbung tritt bei Anwendung von Kupfersulfat nicht hervor.

v. Fürth behauptet zwar beim Schmelzen seines wirk-samen Materials und dessen Acetylverbindung bei Destillation mit Zinkstaub Pyridin erhalten zu haben und gibt ausser der Wahrnehmung eines ähnlichen Geruches noch Reactionen mit Jodkaliumquecksilber, Phosphorwolframsäure, Jodjodkalium, Sublimat und Platinchlorid als Gründe an. Er erwähnt aber nicht das Verhalten zu Bromwasser, Kupfersulfat, Eisen- und Cadmiumchlorid.

Meiner Ansicht nach hat v. Fürth den vollständigen Beweis für seine Angaben nicht geliefert, sondern nur dar-gethan, dass eine basische, flüchtige Substanz von pyridin-ähnlichem Geruch gebildet war. Ich bezweifle jedoch nicht, dass bei Wiederholung der Versuche mit reinem Material in grösserem Massstabe eine oder mehrere Basen der Pyrrol- oder Pyridinreihe gefunden werden, möglicher Weise Pyridin selbst.

Ich habe schon darauf hingewiesen, dass, wenn ein Epinephrinsalz mit concentrirter alkoholischer Lösung von $\text{KOH} + \text{CHCl}_3$ behandelt wird, ein ekelhafter, an Carbylamine erinnernder Geruch wahrgenommen wird. Aus allen hier er-wähnten Versuchen¹⁾ will ich aber bis zur weiteren Erforschung vorläufig nur den Schluss ziehen, dass das Epinephrin eine labile Substanz ist, deren Hauptverhalten eine alkaloide Natur erweist.

Skatol, ein Zersetzungsprodukt des Epinephrins.

Von wesentlich höherem Interesse ist die Zersetzung, welche beim Schmelzen mit KOH vor sich geht, wobei der durchdringende Geruch des Skatols auftritt. Wenn die wässrige Lösung der Schmelze mit Aether ausgeschüttelt wird,

¹⁾ Ich habe noch nicht Gelegenheit gehabt, die eben beschriebenen Versuche mit meinem reinen neueren Präparate zu wiederholen.

so hinterlässt der Aether beim Verdunsten kleine Tröpfchen von fäcalem Geruch, welche beim Auflösen in concentrirter HCl sofort die charakteristische rothe Färbung liefern, wie es Skatol bei sogar kleinen Mengen stets thut.

Eine alkoholische Lösung dieser Tröpfchen gibt mit einem mit HCl benetzten Fichtenspahn eine intensive rothe Färbung: eine Lösung in Benzol gibt mit einer Lösung von Pikrinsäure in Benzol unmittelbar einen Niederschlag von Pikrat in Form röthlicher Tröpfchen; ferner gibt die wässerige Lösung mit Schwefelsäure und Kaliumnitrit eine weisse Trübung, wie es auch Skatol thut. Auch Salkowski's Reaction wurde erhalten, wenn auch unvollkommen, denn die Erzeugung intensiver Färbungen würde grössere Mengen beansprucht haben, als mir zur Verfügung standen.

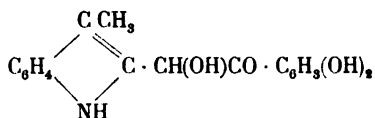
Es kann keinem Zweifel unterliegen, dass dieses Zersetzungsprodukt Skatol ist. Ich habe obige Versuche wiederholt durchgeführt mit kleinen Mengen des freien Epinephrins, seiner Salze und des spontan ausfallenden braunen Oxydationsprodukts. Dieses Verhalten gibt uns aufs Neue die Berechtigung, das Epinephrin den wahren Alkaloiden zuzuzählen. Nach Stöhr¹⁾ gibt auch Strychnin beim Erhitzen mit Kalk Skatol, ferner haben Hoffmann und Königs²⁾ Indol aus Tetrahydrochinolin beim Durchleiten durch ein glühendes Rohr erhalten.

Aus den mitgetheilten Analysen geht hervor, dass die elementare Zusammensetzung des Epinephrins durch die Formel $C_{17}H_{15}NO_4$ ausgedrückt werden kann. Die glatte Darstellung der Acetylverbindung spricht für einen Gehalt von drei Hydroxylgruppen, jedoch ist dieser Schluss nicht als ein endgültiger zu betrachten, da die Bindungsweise des Stickstoffs noch nicht festgestellt ist. Die vorläufigen Versuche mit Phenylhydrazin deuten auf das Vorhandensein einer Keton- resp. Aldehydgruppe hin. Schon jetzt wäre ein Einblick in die Constitution dieser interessanten Verbindung gewonnen, wenn wir annehmen dürften, dass das durch Schmelzen mit Kali entstehende Skatol

¹⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 20, S. 1108.

²⁾ Ibid., Bd. XVI., S. 738.

ein integraler Theil des Epinephrin-Moleküls sei und nicht etwa secundär durch beträchtliche Atomverschiebungen entstanden ist. Das brenzcatechinähnliche Verhalten des Epinephrins gegen Eisenchlorid spricht, wie schon von Fränkel¹⁾ hervorgehoben, für eine benachbarte Stellung zweier der vorhandenen Hydroxylgruppen. Bei der Annahme, dass der Skatolrest als solcher im Molekül existirt, dürfte man sich die Zusammensetzung des Epinephrins in folgender Weise vorstellen:



Eine solche Formel würde meiner schon früher ausgesprochenen Vermuthung, dass das Epinephrin eine Pyrrolbase ist, zu Recht bestehen lassen. Die ausgesprochene chromogene Natur des Epinephrins erführe dann auch eine Erklärung, sowie seine Entstehung im Thierkörper aus eiweissartigen Vorstufen. Eine nahe Beziehung zu der von Nencki²⁾ aus faulendem Eiweiss isolirter Skatolessigsäure würde dann auch vermuthet werden dürfen.

Ich bin mir wohl bewusst, dass es noch viel Arbeit kosten wird, eine endgültige Constitutionsformel für das Epinephrin aufzustellen, und möchte obige Formel vorläufig nur als eine hypothetische, in einigem Maasse den Thatfachen entsprechende aufstellen. Sie soll unter Anderem meine Annahme in Bezug auf den Kerntypus des Epinephrins erläutern. Obwohl aus ihrer Betrachtung nicht ersichtlich ist, in welcher Weise die schon beschriebene Spaltung des Epinephrins in Epinephrinsäure und eine basische, coniinartige Substanz erfolgen soll, so ist doch zu erwähnen, dass auch diese Substanz beim Erhitzen mit Zinkstaub Pyrrol liefert. Ob Protokatechusäure oder eine mit ihr verwandte Substanz, aus Epinephrin abzuspalten ist, habe ich in letzter Zeit nicht zu entscheiden versucht. Jedoch

1) Wiener med. Blätter, 1896, Nr. 14—16.

2) Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wissensch. in Wien, Bd. 98, Abth. II b, Mai 1889.

habe ich schon vor zwei Jahren beobachtet, dass beim Erhitzen des damals gewonnenen Epinephrinbisulfats im zugeschmolzenen Rohre mit 25 % HCl auf 150° C. eine geringe Menge einer in Aether löslichen Substanz erhalten wird, welche auf Zusatz von Eisenchlorid eine grüne Färbung annahm. Ich betrachtete diese Substanz damals als Epinephrin, welches der Einwirkung der Salzsäure entgangen war. Auch wurde mittelst Aether aus dem Röhreninhalt eine Säure gewonnen, welche sich nach Reinigen durch Sublimation der Benzoesäure ähnlich verhielt. v. Fürth¹⁾ hat auch gefunden, dass durch trockene Destillation eine Substanz erhalten wird, welche von Aether sowohl aus saurer als aus alkalischer Lösung aufgenommen wird und die Eisenreaction in gleicher Weise wie Brenzkatechin gibt. Es bestehen daher einige Thatsachen, welche die Anordnung des zweiten Benzolkerns in meiner vorläufigen Formel nicht als allzugewagt erscheinen lassen.

Ueber die pharmakologische Wirkung des Epinephrins.

Eine eingehende pharmakologische Prüfung des Epinephrins wurde noch nicht ausgeführt. Obgleich Extracte der getrockneten oder frischen Nebennieren sehr gut geeignet sind, die merkwürdige Einwirkung auf den Blutdruck und das Herz zu zeigen, sind sie doch zu ausführlicheren pharmakologischen Studien nicht geeignet, weil solche Extracte noch zu viele Verunreinigungen enthalten, worunter solche von beträchtlicher physiologischer Wirkung, wie daraus hervorgeht, dass eine Injection grösserer Mengen des aus den Handelsprodukten hergestellten wässerigen Extracts rasch den Tod herbeiführt, unter Symptomen, welche dem reinen Epinephrin nicht eigen sind. Meine Schüler haben solche Injectionen im vergangenen Winter öfters an Hunden und Kaninchen ausgeführt, um die den Blutdruck erniedrigende Wirkung des Chloroforms wieder aufzuheben. Es kam hierbei fünfmal vor, dass kurz nach Beginn des Ansteigens des Blutdrucks derselbe plötzlich wieder fiel, bis der Nullpunkt des Druckes erreicht war. Während des Fallens

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXIV, S. 150.

war anfänglich die Athmung noch intakt, und beim Oeffnen des Brustkorbes ergab sich Stillstand¹⁾ des Herzens in Diastole. Wie ich zeigen werde, hat reines Epinephrinsalz in grösseren Mengen zunächst eine lähmende Wirkung und bleibt der Blutdruck noch einige Zeit auf hohem Stande, und es bedarf weiterer Injectionen, um bei Unterhaltung der künstlichen Athmung den Blutdruck fallen zu machen. Da es nun gar nicht möglich ist, dass die wässerigen Extracte bei den Versuchen meiner Schüler so viel Epinephrin enthielten, dass dadurch eine Lähmung des Herzens erfolgen konnte, bleibt nur der Schluss übrig, dass andere Constituenten der erwähnten Handelspräparate hierfür verantwortlich zu machen sind. Ich muss deshalb gegen intravenöse Injection zu grosser Dosen des wässerigen Nebennierenextracts bei Anästhesieunfällen meine warnende Stimme erheben. Auch sollten für den allgemeinen ärztlichen Gebrauch die Nebennieren mit grosser Sorgfalt präparirt werden.

Lokale Wirkung der wirksamen Salze.

Zahlreiche Forscher haben darauf aufmerksam gemacht, dass wässerige Nebennierenextracte bei der Conjectiva und anderen Schleimhäuten eine Contraction der Blutgefässe herbeiführen. Diese Wirkung fand ich auch bei meinen wirksamen Epinephrinsalzen. Wenn die durch Reiben mit einem Glasstab oder einem Strom von Aetherdampf hyperämisch gemachte Conjectiva eines Kaninchens mit etwas zerriebenem Epinephrinpikrat oder Bisulfat in Berührung kommt, so geht die Hyperämie sofort zurück. Dasselbe Resultat erfolgt nach Eintröpfeln einer Lösung eines leicht löslichen Epinephrinsalzes in den gerötheten Conjectivalsack. Im ersten Falle bleibt die Wirkung sehr lange erhalten. Ein Tropfen einer starken Lösung des Hydrochlorats bringt auf der Zunge einen geringen Grad von Gefühllosigkeit und einen schwach bitteren Geschmack hervor.

¹⁾ Vgl. Oliver u. Schäfer, Journ. of Physiol., vol. 18. 1895. p. 238. Gottlieb, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak., Bd. 38. S. 112. Gourfein, Compt. rend. Acad. d. sciences. CXXI, 1895. 311. Joà u. Pellacani, Maly's Jahrb. d. Thierchemie, XIII, 129. Marino-Zucco. ibid., XVIII, 231.

Epinephrin ist ein Gift, welches das Athmungscentrum lähmt.

Versuch I.

Injection von 2 mg des wirksamen Bisulfats in den dorsalen Lymphraum eines mittelgrossen Frosches hat Anfangs keine andere Wirkung, als die Athmungsfrequenz zu erhöhen. Nach 10 Minuten stellen sich Zeichen von Depression ein, denn das Thier nimmt nicht mehr seine normale Stellung ein, sondern liegt auf dem Bauche, obgleich es beim Reizen in der gewöhnlichen Weise springt.

Versuch II.

Eine Lösung von etwas weniger als 10 mg Epinephrinhydrochlorid wurde in den dorsalen Lymphraum eines grossen kräftigen Frosches in zwei Dosen in einem Interval von 5 Minuten injicirt. Vor der Injection war die Athemfrequenz 56 pro Minute, unmittelbar nach der ersten Injection stieg dieselbe auf 76 pro Minute. Während die zweite Injection gemacht wurde, fiel die Athemfrequenz auf 52, dann rasch auf 44 und wurde nun langsamer, bis 25 Minuten nach der ersten Injection die Athmung ganz stillstand. Während dieser Zeit war eine zunehmende Schwäche zu bemerken. 15 Minuten nach der ersten Injection machte das Thier beim Legen auf den Rücken nur schwache Gegenbewegungen, trotz der noch vorhandenen schwachen Athmung. Auf kräftige Reize reagierte es nur schwach. Nach Aufhören der Athmung konnte keine Spur mehr von Reflexwirkung hervorgebracht werden und alle willkürliche Bewegung hatte aufgehört. Bei Prüfung des freigelegten N. ischiadicus mit einem schwachen secundären Strom, welcher bei einem Kontrollversuch an dem gleichnamigen Nerven eines enthirnten Frosches als wirksam gefunden wurde, wurde eine normale Muskelcontraction auf der Seite der Reizung herbeigeführt, was die Abwesenheit einer curareartigen Wirkung darthut.

Beim Blosslegen des Herzens wurde constatirt, dass dieses 58 Schläge pro Minute ausführte. Die Contraktionen waren sehr vollständig, wie aus der Blässe des Ventrikels während

jeder Systole hervorging. Die Herzwirkung erinnerte stark an die von Digitalis, wie auch schon von Gottlieb¹⁾ für das Herz des Warmblüters hervorgehoben worden ist.

Ein Kontrollfrosch zeigte nach Zerstörung seines Gehirns einen Herzschlag von 64 pro Minute.

Der Frosch dieses Versuches II blieb in einer feuchten Kammer und liess am folgenden Morgen keine Spur mehr des narkotischen Effects des Epinephrins erkennen. Er blieb nicht mehr auf dem Rücken liegen und beim Drücken des Fusses sprang er wie ein normaler Frosch. Aus diesen von mir noch einmal wiederholten Versuchen schliesse ich, dass das Epinephrin unter die Cerebro-Spinalgifte²⁾ zu rechnen ist.

Versuche an Kaninchen.

Die bis jetzt an warmblütigen Thieren gemachten Versuche stimmen ganz mit den eben beschriebenen überein.

Versuch I.

5 ccm. einer Lösung des Epinephrinhydrochlorids, 25 mg pro Cubikcentimeter enthaltend, wurden langsam in die Randvene des Ohrs eines Kaninchens von 1320 g injicirt. Die Injection des vierten Cubikcentimeters der Lösung war etwa halb vollendet, als das Thier, welches bis dato keinen Widerstand gezeigt hatte, plötzlich eine zuckende Bewegung machte. Vorher konnte nichts anderes als eine enorm beschleunigte Respiration und die heftige rasche Bewegung des Herzens beobachtet werden. Die Spritze wurde nun rasch zurückgezogen und das Thier auf den Boden gesetzt. Unmittelbar darauf traten heftige Krämpfe auf und nach wenigen Anfällen, die ganz an Blausäurewirkung erinnerten, hörte das Thier zu athmen auf.

1) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak., Bd. 38, S. 104.

2) Die hier angeführten Versuche sollen nur einige der gröberen Wirkungen des Epinephrins darlegen. So sind bis jetzt von mir keine Versuche zur genaueren Erforschung seiner Wirkung auf das Rückenmark, Herz, Organe mit glatter Muskulatur u. s. w. ausgeführt worden.

Versuch II.

Bei diesem sollte eine letale Dose in mehreren Abtheilungen und Intervallen einem Kaninchen beigebracht werden, um eine etwaige narkotische Wirkung beobachten zu können. Das Versuchsprotocoll ist folgendes:

Grosses, starkes männliches Kaninchen mit 140 Athemzügen pro Minute, erhält 10 mg von Epinephrin-HCl. in eine Ohrvene. Unmittelbar darauf heftige Herzschläge und beschleunigte Athmung. Nach 3 Minuten 172 Athemzüge pro Minute, soweit Zählung möglich war, und nach 4 Minuten 184.

Nach 10 Minuten erfolgte eine weitere Injection von 34 mg. Athmung bald 152, darauf 140. Herz schlägt rasch und mit grosser Heftigkeit.

Nach weiteren 15 Minuten werden weitere 20 mg injicirt. Wegen der eintretenden Contraction der Blutgefässe wurde es nun sehr schwierig, eine Ohrvene zu finden, die weit genug für die Injection war. Die Ohrgefässe erschienen nun, wenn das Ohr gegen das Licht gehalten wurde, als minutiöse rothe Striche. Da bei der vorigen Injection schon ein Theil der Lösung in das Gewebe um die Ohrvene gelangte, wurde der Rest der Lösung, enthaltend 25 mg, in die Bauchhöhle injicirt. Obgleich das Thier im Ganzen 89 mg in getheilten Dosen erhalten hatte, zeigte es doch keine anderen deutlichen Symptome als die bereits erwähnten vasculären und respiratorischen. Es war noch fähig, herumzuspringen, und obgleich es mir schien, dass die Fähigkeit, sich zu bewegen, beschränkter war als sonst, war ich doch über diesen Punkt nicht ganz sicher. Am folgenden Morgen war das Thier wieder völlig normal und frass wie gewöhnlich. Es scheint daher, dass bei grossen Dosen das Athemcentrum im Kaninchen gelähmt wird, bevor eine narcotische Wirkung entwickelt werden kann.

Versuch III.

Um zu erfahren, ob beim Eintritt der Athmungslähmung die Circulation noch keine Störung zeigt, wurde ein Kaninchen 1820 g schwer in Aetheranästhesie gehalten, seine Trachea

mit einer registrirenden Trommel verbunden und die linke Carotis mit einem Hg-Manometer in der üblichen Weise, während die rechte Jugularvene mit einer Injectionscanüle verbunden wurde. Um 4 Uhr 18 Min. 14 Sek. wurde begonnen mit einer Injection von 106 mg des Epinephrin-HCl, gelöst in 4 ccm. H₂O, sie wurde vollendet um 4 Uhr 19 Min. 55 Sek.

Mit dem ersten Moment begann der Blutdruck zu steigen und die Athemzüge¹⁾ wurden weder mehr frequent noch verstärkt, aber sehr bald darauf, um 4 Uhr 19 Min. 30 Sek., zeigte die Trommel kaum merkliche Erhöhungen des Athemhebels und um 4 Uhr 19 Min. 36 Sek. zeigte sich darauf eine gerade Linie; das Thier athmete nicht mehr. Es war also Lähmung²⁾ der Athmung eingetreten, lange bevor die Injection beendet war! Mit dem Moment dieser Lähmung fing der Blutdruck langsam zu fallen an. Um 4 Uhr 24 Min. 40 Sek. wurde künstliche Respiration eingeleitet und um 4 Uhr 26 Min. 20 Sek. hatte der Blutdruck wieder seinen hohen Stand eingenommen. Der Druck, welcher vor der Injection von 64—68 mm. Hg schwankte, blieb nun auf dem hohen Niveau von 140 mm. und zwar bis 4 Uhr 41 Min., als die

1) Die Athemzüge waren vor der Injection bei Aethernarcose 14 pro 10 Sekunden während dem Ansteigen des Blutdruckes, und 12 Sekunden bevor Respirationsstillstand eintrat, betrugen sie noch 13 pro 10 Sekunden, waren aber nun sehr bedeutend abgeschwächt. Die Einstellung des Marey'schen Tambours mit einem grossen Luftraum verbunden, bei gleichzeitiger partieller Oeffnung der Trachealcannüle, war nicht geeignet, feinere Grade der Verstärkung oder Abschwächung der Respiration darzulegen.

2) Badano hat auch das Aufhören der Respiration constatirt bei Injection von Nebennierenextract. Citirt in der Münch. med. Woch. 1898, C. 475, aus dem Ber. der Med. Akad. zu Genua vom 7. Febr. 1898. Nach Sorona und Moroni wirkt das kalt gewonnene wässerige Extract der Drüse erst excitirend, dann lähmend auf die Herzaction und ebenso auf die Respiration. Citirt, *ibid.*, S. 939, aus *Riform. Med.* 1898, p. 459.

Gourfein's Versuche mit alkoholischen, aus wässerigen Auszügen der Drüse dargestellten Extracten erwiesen auch bei Säugethieren eine immer zunehmende Dyspnoe. Bei Unterhaltung künstlicher Athmung konnte er die Lähmung des Herzens nach weiterer Injection bewirken. *Compt. rend., Acad. d. sc.* CXXI (1895), p. 311.

künstliche Respiration auf einige Sekunden unterbrochen wurde. Der Blutdruck fiel hierbei sofort und da die Hoffnung auf Rückkehr normaler Athmungsthätigkeit aufgegeben werden musste, wurde noch einmal zur künstlichen Athmung geschritten, bevor das Herz zu schwach wurde für weitere Einflüsse.

Um 4 Uhr 52 Min. wurden weitere 50—60 mg des Epinephrin-HCl rasch injicirt, wodurch rapides Sinken des hohen Druckes auf 46 mm. verursacht wurde, welcher Stand etwa 10 Sekunden anhielt, worauf um 4 Uhr 53 Min. der Druck wieder auf 110 mm. anstieg.

Um 4 Uhr 53 Min. 30 Sek. wurde eine weitere rasche Injection von 50—60 mg gemacht, mit dem gleichen Erfolg, dass zunächst ein Sinken eintrat, aber diesmal war die Dose letal für das Herz, denn trotz ausgiebiger künstlicher Athmung fiel der Druck weiter zur Grundlinie, der Puls war nicht mehr fühlbar und beim Oeffnen der Brusthöhle wurde der Ventrikel in schlaffer Diastole vorgefunden, während die Vorhöfe noch schwach sich contrahirten und ihre Schläge in Gruppen erfolgten.

Es ist deshalb evident, dass das Epinephrin in übermässigen Dosen schliesslich auch das Herz warmblütiger Thiere lähmen kann und nicht nur die Athmung. Es geht ferner aus den Versuchen hervor, dass die toxische Dose dieser eigenthümlichen Substanz sehr viel und zwar vielleicht hundertmal höher liegt, als die für einen therapeutischen oder physiologischen Effect nöthige Dosis.

Allgemeine Betrachtungen.

Dass die Nebenniere ein lebenswichtiges Organ ist, steht wohl heute nicht mehr in Zweifel. Dass dem blutdrucksteigernden Bestandtheil dieser Drüse, dem Epinephrin eine physiologische Bedeutung zukommt, wird von Vielen als bewiesen angesehen und ist mindestens sehr wahrscheinlich. Es ist aber zu frühzeitig, dogmatisch über die Unentbehrlichkeit des Epinephrins für den Körper zu reden, denn die Nebenniere mag vielleicht noch andere wichtigere Leistungen zu verrichten haben, als die, das Epinephrin zu liefern. Immerhin haben

die Anhänger der «inneren Secretions-»Theorie eine Anzahl interessanter Beobachtungen zu Tage befördert. So hat Cybulski¹⁾ zuerst bewiesen, dass das aus der Nebenniere abfließende Blut die blutdrucksteigernde Substanz enthält, während das aus anderen Organen stammende venöse Blut keine Spur dieses Körpers aufweist. Langlois²⁾, Biedl³⁾ und Dreyer⁴⁾ haben diese Thatsache dann auch zur Genüge bestätigt. Biedl's Versuche haben es ferner sehr wahrscheinlich gemacht, dass die Produktion des Epinephrins unter dem Einfluss des Nervensystems steht, dass die Nervi splanchnici nicht nur die Vasodilatatoren, sondern auch die Secretionsnerven für die Nebennieren in ihren Bahnen führen. Dreyer hat dann kürzlich festgestellt, dass dem wirklich so ist, dass das Epinephrin in erhöhtem Maasse in das venöse Blut ausgeschieden wird, wenn der N. splanchnicus unterhalb des Zwerchfells durch Inductionsströme gereizt wird, und dass diese erhöhte Secretion unabhängig ist von der gleichzeitig in der Drüse durch die Reizung hervorgerufenen Gefässerweiterung. Es scheint also bewiesen zu sein, dass das Organ mehr oder weniger Epinephrin zu liefern im Stande ist, je nach der Thätigkeit seiner secretorischen Nerven.

Was sind nun die Beziehungen des Epinephrins zur Addison'schen Krankheit? Die erste Frage, welche sich hier aufdrängt, ist die: Besteht irgend ein chemischer Zusammenhang zwischen dem Epinephrin selbst oder seinen Vorstufen und dem bekannten, bei der Bronzekrankheit in der Haut und Schleimhäuten abgelagerten Pigment?

Wie bekannt, hat Mühlmann⁵⁾ diese Frage dahin beantwortet, dass das Pigment der bronzefärbten Haut aus oxydirtem Brenzcatechin bestehe. «In der Nebenniere wird Brenzcatechin producirt, in geringen Dosen gelangt es in das Blut

1) Anzeiger d. Akad. d. Wissensch. in Krakau, 4. März 1895, aus Szymonowicz, Pflüger's Archiv, Bd. 64, S. 145, citirt.

2) Revue scientifique, 1897. p. 303.

3) Pflüger's Archiv, Bd. 67, S. 477.

4) Americ. Journ. of Physiol., vol. II, p. 203.

5) Loc. cit.

und wird durch den Harn ausgeschieden. Die überschüssige Menge des gebildeten Brenzcatechins, welche, falls sie ins Blut gekommen wäre, giftig wirken könnte, wird durch die Thätigkeit der sympathischen Ganglienzellen der Nebenniere oder des Ganglion solare eliminirt. Ist es einmal zu einer Ansammlung von Brenzcatechin im Organismus gekommen, so haben wir die Addison'sche Krankheit vor uns: das Brenzcatechin pigmentirt die Haut und ruft alle jene giftigen Erscheinungen hervor, welche die Bronzekrankheit charakterisiren.¹⁾ Diese Theorie ist aber eine ganz irrige, denn es ist kein Brenzcatechin in der Nebenniere vorhanden.

Diese Frage lässt sich vorläufig gar nicht entscheiden. Es müssen erst chemische Versuche behufs Isolirung des in der Haut bei der Bronzekrankheit abgelagerten Pigments angestellt werden. Erst wenn die chemische Untersuchung etwas Definitives über die Natur dieses Pigments zu Tage gebracht hat, kann man von einer Beziehung oder Nicht-Beziehung dieses Pigments zu einem Nebennierenbestandtheil reden.

Vorläufig werden alle Vermuthungen über den Ursprung des in Frage stehenden Pigments durch folgende Umstände vereitelt. Erstens dadurch, dass ähnliche Hautpigmentirungen bei verschiedenen anderen pathologischen Zuständen auftreten, so bei der chronischen Arsenvergiftung, bei gewerblichen Schädigungen, bei tiefgreifenden Ernährungsstörungen u. s. w.: zweitens dadurch, dass bei schnell tödtlich verlaufenden Fällen dieser Krankheit die Bronzefärbung oft ganz ausbleibt. Betreffs dieses letztgenannten Umstandes mag auf die pathologisch-anatomischen Erhebungen Fenwicks²⁾ aufmerksam gemacht werden, nach welchen die Thatsache hierbei massgebend sein soll, ob zuerst, oder mehr ausgesprochen, die Marksubstanz oder die corticale Substanz degenerirt ist. In Fällen, wo die Marksubstanz frühzeitig und total verkäst ist, sollen die allgemeinen Symptome der Krankheit in sehr schwerer Form auf-

¹⁾ Virchow's Archiv, Bd. 146, S. 267.

²⁾ Transactions Path. Soc. London, vol. 33, p. 353.

treten, während die Pigmentation ausbleibt; der Tod tritt ein (innerhalb 5 Monaten), bevor es zur Pigmentation kommt.

Nun ist allgemein bekannt, dass das Epinephrin nur in der Marksubstanz und nicht in der Corticalsubstanz gebildet wird. Auch haben Schäfer und Oliver¹⁾ gezeigt, dass keine Spur des Epinephrins aus einer Nebenniere, deren Marksubstanz total verkäst ist, extrahiert werden kann. Daher würden auch die oben genannten Fälle ihre Beweiskraft gegen die Annahme der Entstehung des Pigments aus dem Epinephrin verlieren, denn es wäre in jenen Fällen gleich von Anfang an kein Epinephrin vorhanden. Wie und warum aber, bei Vorhandensein des Epinephrins, dieses in den Bronzefarbstoff verwandelt werden würde, bliebe immer noch ein Räthsel. Andererseits könnte man die Frage aufwerfen, ob nicht das fragliche Pigment aus einer Vorstufe des Epinephrins entstehe, und ob die Bronzefärbung nur eintritt, wenn die Drüse unfähig wird, jene Substanz zu bilden. Bei dem jetzigen Stande unserer Kenntniss der hier obwaltenden Verhältnisse kann man es nicht sicher behaupten, dass irgend eine Beziehung zwischen dem Epinephrin und dem Pigment der Bronzekrankheit existirt.

Immerhin ist es eine sehr auffallende Thatsache, auf welche in dieser Abhandlung schon mehrmals hingedeutet worden ist, dass Lösungen des Epinephrins so ausserordentlich leicht, so schon beim blossen Stehen an der Luft, ein braunes Pigment ausscheiden, welches sich in vieler Beziehung wie ein thierisches Pigment verhält. Die Unlöslichkeit dieser Substanz in Blutserum, wie ich bestätigen kann, würde sie zur Ablagerung in pigmentführenden Zellen geeignet machen.

Wie bei dem Verhältniss zwischen Epinephrin und dem Pigment der Bronzekrankheit, so steht es auch bei dem Verhältniss zwischen jener Substanz und anderen Symptomen dieser Krankheit, wie z. B. die ausgesprochenen Schwächeerscheinungen, der Kopfschmerz, die Anfälle von Schwindel, die terminalen schweren nervösen Erscheinungen, die Verdauungsstörungen

1) Journ. of Physiol., vol. 18 (1895). p. 269.

u. s. w. Ein ursächlicher Zusammenhang ist auch hier vorläufig nicht zu postulieren. Es lässt sich nicht übersehen, in welchem Maasse oder ob überhaupt diese Symptome durch gänzlichen Wegfall oder zu geringe Produktion der blutdrucksteigernden Substanz verursacht werden. Auch sind wir ganz im Dunkel über eine etwaige Giftigkeit jener Substanzen, welche als Vorstufen des Epinephrins functioniren. Wir haben gesehen, dass das Epinephrin selbst, in übergrossen Mengen in den Kreislauf gebracht, ein starkes Nervengift ist. Bei übermässiger Produktion, in Folge Reizzustände der Nebennieren, könnte also eine Vergiftung, eine «Autointoxication», erfolgen. Andererseits würde ebenfalls eine Vergiftung erfolgen können bei totaler Degeneration der Drüse, wenn die Vorstufen¹⁾ des Epinephrins diesem in ihrer Giftigkeit nur annähernd gleichen.

Wir bewegen uns aber hier in einem Reiche der Speculation, und ich möchte es wohl verstanden wissen, dass meine obigen Bemerkungen nur als auf Möglichkeiten hindeutend aufzufassen sind. Es wäre unerlaubt, den Thatsachen der zukünftigen Forschung voraneilen zu wollen.

Eine andere Frage, welche Aussichten auf eine baldige Lösung aufweist, ist die die normale Ausscheidung des Epinephrins betreffende.

Ich habe den Urin eines Hundes untersucht, welcher beträchtliche Mengen eines wirksamen Epinephrinsalzes (20 mg oder mehr) in die Inguarvene injicirt enthalten hatte. In diesem Falle nahm der Urin auf Zusatz von Natronlauge eine dunkelbraune Farbe an, ferner eine grüne mit Eisenchlorid, eine Färbung, die noch besser hervortrat bei Filtration nach diesem Zusatz. Es ist deshalb klar, dass nach intravenöser Injection das Epinephrin zum Theil unverändert im Harne

1) Hierbei ist auch in Betracht zu nehmen, dass die Drüse noch andere giftige Substanzen als das Epinephrin enthält, so z. B. die stark blutdruckerniedrigende Substanz. Eine chemisch-physiologische Erklärungsweise des Zustandekommens der oben genannten Symptome müsste auch gegenüber allen solchen Körpern, beziehungsweise deren Vorstufen, gerecht werden.

wieder erscheint, oder wenigstens nur so weit verändert wird, dass die Reaction mit Eisenchlorid noch erhalten wird. Ob ein solcher Urin blutdrucksteigernd wirken kann, habe ich noch nicht geprüft.

Es ergibt sich nun naturgemäss die Frage, wie das Epinephrin im normalen Zustande im Urin wieder erscheint. Die Vermuthung, dass es unter normalen Umständen völlig oxydirt wird, ist nach Obigem, sowie nach dem Kerntypus dieser Substanz kaum anzunehmen. Wir haben ferner gesehen, dass das Epinephrin durch Einwirkung verschiedener oxydirender Agentien intensive Färbungen annimmt, und deshalb dürfte man vor Allem prüfen, ob nicht unter den Harnpigmenten sich solche befinden, welche auf Epinephrin zurückzuführen sind.

In der That zeigt der als Uroerythrin bezeichnete, dem ziegelrothen Harnsedimente anhaftende Farbstoff einige der Reactionen des Epinephrins. Thudichum¹⁾ hat beobachtet, dass festes Uroerythrin durch Kalilauge sofort dunkelgrün gefärbt wird, und Riva, Zoja und Garrod haben die Thatsache befestigt, dass auf Zusatz von viel Lauge zu einem an Uroerythrin reichen Harn ein schmutzig grüner Phosphatniederschlag entsteht. Garrod²⁾ erwähnt auch, dass die amyalkoholische Lösung des Uroerythrins auf Zusatz von wenig Natronlauge eine rein grüne Färbung annimmt. Nun ist das Epinephrin das einzige bis jetzt bekannte Produkt des Thierkörpers, welches sich in seinem Verhalten in dieser Beziehung dem Uroerythrin an die Seite stellen lässt, denn wie ich schon mehrmals erwähnt habe, nimmt eine Lösung des inactiven Epinephrins auf Zusatz von wenig Lauge eine rein grüne Färbung an. Riva³⁾ beobachtete auch, dass manchmal eine Uroerythrinlösung auf Zusatz von Lauge violett, dann indigoblau, grün und darauf schnell farblos wird. Einen ähnlichen Farbenwandel kann man auch bei der wirksamen Form des Epinephrins beobachten.

Versuche mit einer sehr geringen Menge eines von einem Schüler dargestellten Präparates von Uroerythrin, für dessen Rein-

1) Journ. chem. Soc. [2] 13. p. 399.

2) Journ. of Physiology.

3) Neubauer u. Vogel, Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 585.

heit ich nicht eintreten will, zeigten, dass es die Mandelin'sche Reaction sowie die mit concentrirter $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{KMnO}_4$ liefert und zwar so, dass sie von denen des Epinephrins nicht zu unterscheiden sind. Auch geben die rothen Harnsäuresedimente letztere Reaction in schönster Weise und liefern auch beim Schmelzen mit Kali ansehnliche Mengen von Skatol. Hierbei ist zu betonen, dass dem unter diesen Umständen erscheinenden Skatol keine Beweiskraft für seine Entstehung aus Uroerythrin ertheilt werden kann, da Zoja¹⁾ aus Urohämatoporphyrin auch Skatol erhalten hat.

Aus diesen Vorversuchen soll nur gefolgert werden, dass das Uroerythrin möglicher Weise ein Umwandlungsprodukt des im Thierkörper normal gebildeten Epinephrins ist. Die genannten Versuche ermuthigen zu einer weiteren Prüfung der Frage und es werden jetzt in meinem Laboratorium Versuche angestellt, grössere Mengen von Uroerythrin herzustellen, um weitere und genauere Vergleiche anstellen zu können.

Man wird leicht erkennen, dass die Kenntniss des Verhaltens des Epinephrins im normalen Gesundheitszustand zu interessanten Aufschlüssen in Betreff des Urins bei der Addison'schen Krankheit führen kann, dass also die Diagnose bei dieser Krankheit durch Harnuntersuchung möglicher Weise erleichtert werden könnte.

Zusammenfassung.

1. Der blutdrucksteigernde Bestandtheil der Nebenniere ist eine besondere unbeständige basische Substanz, deren procentische Zusammensetzung durch die Formel $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ ausgedrückt wird und welche ich Epinephrin nenne.

2. Diese Substanz wurde aus den wässerigen Extracten jener Drüse als Benzoylverbindung isolirt und aus dieser wurden verschiedene physiologisch wirksame Salze genommen.

3. Die freie Base kann nicht ohne bedeutende Veränderung (Umlagerung zu einer wirkungslosen Substanz) und Verlust der physiologisch wirksamen Eigenschaften dargestellt werden.

¹⁾ Maly's Jahreshb. f. Thierchemie. Bd. 23. s. 590.

4. Das Verhalten des Körpers bei der trockenen Destillation und in der Kalischmelze, die elementare Zusammensetzung, sowie das Verhalten zu verschiedenen Reagentien deuten auf die Alkaloidnatur desselben. In Bezug auf den Kerntypus darf man den Körper zu den Pyrrol-, resp. Skatolbasen zählen. Die Totalanzahl von (OH)-Gruppen steht noch nicht ganz fest, ebenfalls ist die Unterscheidung zwischen einer Aldehyd- oder Ketongruppe in seinem Molekül noch nicht vollendet und die Bindungsweise des Stickstoffs noch nicht sicher gestellt. Bei der Kalischmelze entstehen ansehnliche Mengen von Skatol.

5. Ein dunkles Pigment, Epinephrinsäure, entsteht stets, wenn Epinephrin mit verdünnten Alkalien behandelt wird. Ein zweites mit verdünnten, sowie mit stärkeren Alkalien erzeugtes Produkt ist basischer Natur von nicht scharf zu präcisirendem, aber coniin- oder pyridinähnlichem Geruch.

6. Die wirksamen Salze des Epinephrins haben eine markante Contractionswirkung auf die Blutgefäße bei localer Anwendung, haben einen schwach bitteren Geschmack und bringen in leichtem Grade Gefühlslosigkeit auf der Zunge hervor. Bei Einführung in den Kreislauf bringen diese Salze eine bedeutende und bei richtiger Anwendung eine lang andauernde Blutdrucksteigerung hervor. Trocken aufbewahrt, büssen alle Salze mit der Zeit sehr an ihrer Löslichkeit ein, was bis jetzt der Anwendung genannter Salze noch sehr im Wege steht. Sie erregen zuerst, dann lähmen sie die Athmung durch Wirkung auf die Centren. Erst später nach weiteren Gaben wird das Herz gelähmt. Die toxische und letale Dose liegt weit über derjenigen, bei der eine wesentliche physiologische Wirkung ohne Schaden erfolgt.

7. Im normalen Zustand des Thieres und des Menschen geht das Epinephrin möglicher Weise in den Harn als Uroerythrin über, welches die Eigenschaft hat, Harnsäuresedimenten eine Rosafärbung zu ertheilen.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, der Firma P. D. Armour u. Co. in Chicago meinen besten Dank auszusprechen für die grosse Liberalität, mit welcher diese Herren mir entgegengekommen sind, indem sie mir in den

letzten drei Jahren wässerige Extracte, nach meiner Vorschrift aus mehreren Hundert Kilo frischer Nebennieren des Rindes dargestellt, freigebig geliefert haben. Auch gebührt mein Dank den Herren Dr. W. Jones und A. C. Crawford, dem ersteren für seine öfters geleistete Hülfe bei den chemischen Analysen. letzterem für seine stetige Unterstützung bei den physiologischen Versuchen dieser sowohl als meiner früheren Abhandlungen über diesen Gegenstand.

Baltimore, den 14. Juli 1899.

Ueber das Eierstockcolloid.

Von

Dr. Theodor Panzer, Assistent.

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Juli 1899.)

In menschlichen Eierstöcken kommen Geschwülste vor, welche aus einer gelblichen, zitternden Gallerte bestehen und die klinischen Namen Cystoma pseudomucinosum, Eierstockcolloid u. dgl. führen. Die Substanz dieser Tumoren, als Colloid, Pseudomucin β , Paramucin bezeichnet, ist dadurch ausgezeichnet, dass sie sich in Wasser nicht löst, dass sie mit verdünnten Alkalien Lösungen gibt, in welchen Essigsäure nur eine Trübung, aber keinen flockigen Niederschlag erzeugt, dass sie in getrocknetem Zustande mit Wasser übergossen wieder zu einer Gallerte aufquillt, und dass sie bei der Spaltung einen reducirenden Körper liefert.

Derartige Stoffe sind noch wenig studirt. Virchow¹⁾ und Pfannenstiel²⁾ geben ausser den angeführten Eigenschaften nur wenige Details an. Die einzige eingehende Untersuchung, auf die im Verlaufe dieser Abhandlung noch wiederholt zurückgegriffen werden soll, rührt von Katharina Mitjukoff.³⁾

Da mir grössere Mengen dieser Substanz zur Verfügung standen, beschäftigte ich mich mit der Untersuchung derselben.

1) Virchow, Das Eierstockscolloid. Verhandlungen der Gesellschaft für Geburtshilfe in Berlin, III. Jahrgang 1848, S. 203.

2) Pfannenstiel, Ueber die Pseudomucine der cystischen Ovariengeschwülste. Arch. f. Gynäk. Bd. 38, S. 407.

3) Katharina Mitjukoff, Ueber das Paramucin. Arch. f. Gynäk. Bd. 49, S. 278.

Obwohl es mir nicht gelang, die Natur derselben in erwünschtem Maasse aufzuklären, so will ich doch im Folgenden die Ergebnisse meiner Versuche mittheilen, da dieselben immerhin von einigem Interesse sein dürften.

Das von mir verarbeitete Material stammte von mehreren Fällen, welche auf den hiesigen gynäkologischen Kliniken operirt worden waren. Jeder einzelne Tumor zeigte die oben angeführten Eigenschaften. Zur Untersuchung wurden zunächst die blutfreien Stellen der Gallerte von den blutig gefärbten mechanisch getrennt und die letzteren nur für solche Versuche verwendet, bei welchen der geringe Blutgehalt, der durch Auswaschen sich nicht entfernen lässt, das Resultat nicht beeinträchtigen konnte. Auf eine Reindarstellung der Substanz wurde zunächst verzichtet, um die Natur derselben möglichst wenig zu verändern.

Zur Prüfung der Löslichkeitsverhältnisse wurde je eine grössere Portion der Gallerte (je ca. 200 g) in Wasser, 95%igen Alkohol, verdünnte Schwefelsäure und verdünnte Natronlauge gebracht, gut durchgeschüttelt, nach 24 Stunden die Flüssigkeiten abgegossen, filtrirt und die Filtrate zur Trockene abgedampft.

Die wässrige Flüssigkeit, welche ganz schwach alkalisch reagirte, hinterliess nur einen Hauch eines Rückstandes, der Fehling'sche Lösung nicht reducirte.

Im Alkohol schrumpfte die Masse stark, wurde undurchsichtig und gab an den Alkohol eine immerhin nennenswerthe Menge einer im trockenen Zustande weissen, amorphen, spröden Masse ab, welche Fehling'sche Lösung stark reducirte.

Die verdünnte Schwefelsäure löste nur wenig auf. In dieser Lösung erzeugte Natronlauge bis zur genauen Neutralisation zugefügt eine geringe Menge eines flockigen Niederschlages, der sich im Ueberschusse der Lauge wieder leicht löste und alkalische Kupferlösung reducirte. Ob das Colloid in Alkohol und verdünnter Schwefelsäure etwas löslich ist, oder ob die beiden Reagentien nur Beimengungen gelöst oder die Substanz zersetzt haben, will ich zunächst nicht entscheiden: sicher ist, dass kein Zucker beigemischt war.

Verdünnte Natronlauge bewirkte nach einigen Stunden eine fast vollständige Lösung. Die hierbei resultirende hellgelbe, viscide Flüssigkeit zeigte folgende Reactionen:

Beim Kochen trübt sich die Flüssigkeit nicht und scheidet auch auf Säurezusatz keinen flockigen Niederschlag ab.

Verdünnte Essigsäure, verdünnte Schwefelsäure, verdünnte Salzsäure rufen nur eine Trübung hervor, die im Ueberschusse der Reagentien nicht verschwindet.

Ebenso bewirkt Salpetersäure nur eine Trübung, auf weiteren Zusatz der Säure tritt aber Klärung ein.

Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure, Gerbsäure, sowie Alkohol erzeugen reichliche flockige Fällungen.

Ein gleiches Volumen einer gesättigten Lösung von schwefelsaurem Ammonium zur alkalischen Lösung zugesetzt, bringt einen flockigen Niederschlag hervor, während schwefelsaures Natrium oder Chlornatrium erst bis zur Sättigung in die alkalische Flüssigkeit eingetragen dasselbe Resultat erzielt. Schwefelsaures Magnesium fällt weder in alkalischer, noch in der angesäuerten Lösung.

Von den allgemeinen Alkaloidreagentien: Jodjodkalium, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid erzeugt in der mit Salzsäure angesäuerten Lösung nur das letztere einen Niederschlag.

Die nun folgenden Reactionen wurden direkt mit der ursprünglichen Gallerte angestellt. Dieselbe gab nämlich die Biuret-, Xanthoproteinsäure- und Millon'sche Reaction, während die Adamkiewicz'sche und Liebermann'sche Reaction nur undeutlich ausfielen. Mit α -Naphtol und concentrirter Schwefelsäure entstand Violettfärbung, mit Thymol und concentrirter Schwefelsäure Rothfärbung. Beim Kochen mit alkalischer Bleilösung schied sich Schwefelblei ab. Fehling'sche Lösung wurde bei Siedehitze zwar nicht sofort, sondern erst bei mehrere Minuten andauerndem Kochen, dann aber deutlich reducirt.

Eine grössere Anzahl dieser Reactionen wurde auch von Mitjukoff angestellt. Dieselben fielen jedoch nur ähnlich aus, indem die angeführten Säuren dort immer flockige Niederschläge erzeugten. Dieser Unterschied dürfte jedoch nicht so

schwerwiegend sein, da hierbei der Gehalt an Salzen und anderweitigen Beimengungen, namentlich aber die Dauer der Einwirkung von Lauge, eine Rolle spielen mag.

Zur ungefähren Orientirung wurde einer der Tumoren auf seine elementare Zusammensetzung untersucht.

15,4194 g der feuchten, blutfreien Gallerte hinterliessen nach dem Trocknen bei 110° 1,0640 g Rückstand und nach dem Glühen unter den für Aschenbestimmungen gebotenen Cautelen 0,1847 g Asche. Die Gallerte enthält demnach:

Wasser	93,10 %
Organische Substanzen . . .	5,70 %
Asche	1,20 %
	<hr/> 100,00 %

1,1560 g der durch vorsichtiges Glühen über dem Bunsenbrenner aus blutfreier Gallerte erhaltenen Asche wurden der Analyse nach der Methode von Bunsen unterworfen.

Der in Wasser lösliche Theil der Asche enthielt:

Kaliumoxyd	0,1245 g
Natriumoxyd	0,4291 „
Calcium und Magnesium	Spuren
Chlor	0,4472 „
Schwefelsäureanhydrid	0,1200 „
Phosphorsäureanhydrid	0,0045 „
Kohlensäureanhydrid	0,0800 „
Summe . . .	<hr/> 1,2053 g
Ab die dem Chlor äquivalente Menge Sauerstoff	0,1009 „
Löslicher Theil	<hr/> 1,1044 g

Der in Wasser unlösliche Theil enthielt:

Calciumoxyd	0,0336 g
Magnesiumoxyd	0,0130 „
Phosphorsäureanhydrid	0,0012 „
Kohlensäureanhydrid	0,0088 „
Unlöslicher Theil	<hr/> 0,0566 g
Aus den Einzelanalysen berechnete Summe . .	1,1610 g
Gewicht der verwendeten Asche	1,1560 „

Analytische Belege.

Die Lösung des in Wasser löslichen Theiles wurde auf 250 ccm. gestellt.

50 ccm. dieser Lösung gaben im Ludwig'schen Kohlensäurebestimmungsapparate 0,0160 g Kohlendioxyd ab. Die aus dem Apparate herausgespülte und eingeengte Flüssigkeit gab 0,0015 g pyrophosphorsaures Magnesium, entsprechend 0,0009 g Phosphorsäureanhydrid.

50 ccm. gaben 0,2011 g Chloralkalien und 0,1283 g Kaliumplatinchlorid, entsprechend 0,0249 g Kaliumoxyd und 0,0858 g Natriumoxyd.

50 ccm. gaben 0,0699 g schwefelsaures Baryum, entsprechend 0,0240 g Schwefelsäureanhydrid.

50 ccm. gaben 0,3539 g Chlorsilber und 0,0060 g Silber, zusammen entsprechend 0,0894 g Chlor.

Der in Wasser unlösliche Theil gab im Kohlensäurebestimmungsapparate 0,0088 g Kohlendioxyd ab. Die aus dem Apparate herausgespülte Flüssigkeit wurde eingedampft, der Rückstand mit concentrirter Salpetersäure aufgenommen und in die Lösung 1 g Zinn, entsprechend 1,55 g Schwefelzinn, eingetragen. Die mit Wasser verdünnte Masse wurde filtrirt. Das Filtrat gab 0,0336 g Calciumoxyd und 0,0362 g pyrophosphorsaures Magnesium, entsprechend 0,0130 g Magnesiumoxyd. Der Filtrationsrückstand wurde in verdünnter Kalilauge gelöst, die Lösung mit Schwefelwasserstoff gesättigt und mit Essigsäure angesäuert. Die so erhaltene Flüssigkeit sammt dem ausgeschiedenen Schwefelzinn wog 252,86 g. Dieselbe wurde durch ein trockenes Filter filtrirt und von dem Filtrate 182,67 g zur Bestimmung der Phosphorsäure verwendet, welche 0,0013 g pyrophosphorsaures Magnesium, entsprechend 0,0004 g Phosphorsäureanhydrid, lieferte.

Eine grössere Menge der Gallerte nach Zusatz von kohlensaurem Natron vorsichtig verbrannt, gab eine Asche, die frei von Jod war.

Der Gehalt an Schwefelsäure wurde ausserdem noch in einer Portion bestimmt, welche über einem Spiritusbrenner in einem abgesonderten Zimmer verascht worden war, um den Einfluss der schwefelhaltigen Laboratoriumsluft auszuschliessen. 0,6848 g Asche gaben hierbei 0,1476 g schwefelsauren Baryt, entsprechend 0,0507 g Schwefelsäureanhydrid.

standtheile unter Berücksichtigung des zuletzt angeführten Werthes für Schwefelsäure als Metalle und Säurereste ausgedrückt, so ergibt sich folgende procentische Zusammensetzung der Asche:

Kalium (K)	9,16%
Natrium (Na)	28,24%
Calcium (Ca)	2,12%
Magnesium (Mg)	0,70%
Chlor (Cl)	39,63%
Schwefelsäurerest (SO ₄)	8,84%
Phosphorsäurerest (PO ₄)	0,58%
Kohlensäurerest (CO ₂)	10,73%
	<hr/> 100,00%

Ein flüchtiger Blick auf diese Tabelle lässt sofort das bemerkenswerthe Verhältniss $\frac{\text{Kalium}}{\text{Natrium}} = \frac{1}{3}$ in die Augen springen. Dasselbe steht in der Mitte zwischen demjenigen, welches thierische Flüssigkeiten (für Blutserum ungefähr $\frac{1}{10}$), und demjenigen, welches lebende Zellen zeigen (in den rothen Blutkörperchen eine nennenswerthe Menge von Kalium gegenüber Spuren von Natrium).

Zur Ausführung der organischen Elementaranalyse wurde blutfreie Gallerte durch Leinen gepresst, mit Wasser durch Decantation gut gewaschen, auf dem Wasserbade getrocknet, der fein zerriebene Rückstand mit Alkohol und darauf mit Aether extrahirt.

I. 0,9241 g trockener Substanz hinterliessen nach vorsichtigem Verbrennen 0,0594 g Asche, welche aus Oxyden, Sulfaten und Phosphaten von Calcium und Magnesium bestand.

II. 0,2078 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem chromsauren Blei, Kupfer und Kupferoxyd 0,1097 g Wasser, entsprechend 0,0122 g Wasserstoff und 0,3595 g Kohlensäure, entsprechend 0,09810 g Kohlenstoff.

III. 0,1907 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem chromsauren Blei, Kupfer und Kupferoxyd 0,1003 g

Wasser, entsprechend 0,0112 g Wasserstoff und 0,3304 g Kohlensäure, entsprechend 0,0902 g Kohlenstoff.

IV. 0,2076 g Substanz gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas-Ludwig 14,7 ccm. Stickstoff bei 12,7° C. und 750,0 mm. Barometerstand.

V. 0,2381 g Substanz gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas-Ludwig 16,9 ccm. Stickstoff bei 13,4° C. und 749,0 mm. Barometerstand.

VI. 0,4550 g Substanz nach Carius zerstört gaben 0,0254 g schwefelsaures Baryum, entsprechend 0,0035 g Schwefel. Das Filtrat davon mit Molybdänsäure behandelt gab 0,0099 g pyrophosphorsaures Magnesium, entsprechend 0,0028 g Phosphor.

VII. 0,4628 g Substanz ebenso behandelt gaben 0,0274 g schwefelsaures Baryum, entsprechend 0,0038 g Schwefel und 0,0080 g pyrophosphorsaures Magnesium, entsprechend 0,0022 g Phosphor.

In Procenten ausgedrückt:

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	Mittel
C	—	47,23	47,30	—	—	—	—	47,27
H	—	5,88	5,85	—	—	—	—	5,86
N	—	—	—	8,39	8,41	—	—	8,40
S	—	—	—	—	—	0,77	0,81	0,79
P	—	—	—	—	—	0,61	0,48	0,54
Asche	6,43	—	—	—	—	—	—	6,43

Da die Substanz bei der Vorbereitung zur Elementaranalyse nicht mit Säuren behandelt wurde, so kann der hohe Gehalt derselben an mineralischen Bestandtheilen, namentlich den in Wasser unlöslichen, nicht auffallen.

Der Phosphorgehalt ist so gering, dass er wohl ganz als der Verunreinigung mit mineralischen Bestandtheilen angehörig betrachtet werden kann. Erwähnt mag noch werden, dass die Gallerte mit verdünnter Schwefelsäure gekocht und mit Ammoniak übersättigt mit Silberlösung keinen Niederschlag gab zum Beweise, dass Xanthinbasen als Spaltungsprodukte nicht auftreten. Damit dürfte es gerechtfertigt sein, wenn im Folgenden der Gehalt an Phosphor unberücksichtigt bleibt. Demnach ergeben sich folgende Mittelwerthe für aschenfreie

Substanz, wobei die Ungenauigkeit, welche der Schwefelgehalt bedingt, nicht beachtet werden soll:

50,52% C, 6,26% H, 8,98% N, 0,84% S, 33,40% O.

Vergleicht man diese Zahlen mit den von Mitjukoff (51,76% C, 7,76% H, 10,70% N, 1,09% S, 28,69% O) und Pfannenstiel (9,45% N) gefundenen, so ist die Uebereinstimmung wohl nicht sehr weitgehend. Allerdings kann ich dem Einwande nicht begegnen, dass meine Substanz nicht rein war, anderseits aber könnte auch die Behandlung mit verdünnten Säuren, wie sie Mitjukoff zur Reinigung ihrer Substanz angewendet hat, schon Veränderungen setzen. Immerhin wäre es auch denkbar, dass die einzelnen Tumoren auch aus verschiedenen Körpern bestehen.

Untersuchung des reducirenden Complexes.

Bekanntlich liefert das Colloid bei der Spaltung mit verdünnten Säuren einen reducirenden Körper. Zur Isolirung desselben wurde folgender Versuch angestellt:

1 kg mit Wasser gewaschener Gallerte wurde mit 2%iger Schwefelsäure 2 Stunden lang gekocht. Diese Bedingungen schienen nach einigen Vorversuchen die günstigsten zu sein. Das Reactionsgemisch wurde zunächst einige Tage gegen öfter gewechseltes destillirtes Wasser dialysirt und die Dialysate gesammelt. Die Dialyse wurde dann noch einige Tage mit fliessendem Wasser fortgesetzt. In der im Pergamentpapierbeutel befindlichen Flüssigkeit schieden sich bald reichliche Mengen von braunen Flocken aus, über deren Untersuchung später berichtet werden soll.

Die vereinigten Dialysate wurden mit Bleizucker im Ueberschusse versetzt und die von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit mit Ammoniak übersättigt. Der reichlich ausgeschiedene Niederschlag, von der Flüssigkeit durch Filtration getrennt und mit ammoniakhaltigem Wasser chlorfrei gewaschen, wurde in Wasser suspendirt und durch Kohlensäure zerlegt. Die vom kohlensauren Blei abfiltrirte Flüssigkeit, in Platingefässen im Vacuum bei ca. 50° C. zur Trockene eingedampft, hinterliess eine gelbe, spröde, amorphe Masse,

welche an der Luft Feuchtigkeit anzog, zu einem Syrup zerfloss und sich dunkler färbte. Derselbe konnte auch durch monatelanges Stehen im Vacuum über Schwefelsäure bei niedriger Temperatur nicht zur Krystallisation gebracht werden.

Die so dargestellte Substanz enthält Stickstoff und ist frei von Schwefel. Die wässrige Lösung derselben schmeckt nicht süß, reducirt Fehling'sche Lösung stark, gibt die Rubner'sche Zuckerreaction (mit Bleizucker und Ammoniak bei gelindem Erwärmen Rosafärbung), die Molisch'sche Probe mit α -Naphtol und Schwefelsäure, nicht aber die Biuret- und Millon'sche Reaction und dreht die Ebene des polarisirten Lichtes nicht.

Mit essigsauerm Phenylhydrazin erwärmt, scheidet sie beim Abkühlen eine Verbindung ab, welche aus gelben, radiär gestreiften Kugeln besteht. Die letztere wurde aus heissem 60%igen Alkohol so lange umkrystallisirt, bis zwei aufeinanderfolgende Krystallisationen denselben Schmelzpunkt zeigten, welcher bei 166° lag. Ein weiteres Umkrystallisiren aus heissem Benzol veränderte den Schmelzpunkt nicht mehr.

Mit salzsaurem Hydroxylamin und Sodalösung entstand kein schwerlösliches Oxim.

Mit Hefe, welche auf ihre Gährungsfähigkeit geprüft worden war, vergohr die Lösung nicht.

Auf die Ausführung der Elementaranalyse musste verzichtet werden, weil die Substanz nicht genügend rein schien.

Um zu entscheiden, ob eine Pentose oder ein Pentosan vorliegt, wurde die Lösung der Substanz mit Phloroglucin und Salzsäure erwärmt; es entstand nicht die für Pentosen charakteristische kirschrothe Färbung, sondern eine carminrothe Lösung, welche spectroscopisch geprüft auch den typischen Absorptionsstreifen im Gelbgrün vermissen liess.¹⁾

Ungefähr 1 g des Syrops mit Salzsäure vom spec. Gew. 1,06 destillirt, lieferte ebensowenig Furfurol als die ursprüngliche Gallerte.

Zur Prüfung auf Hexosen wurde aus dem Syrup nach

1) Tollens, Handbuch der Kohlehydrate, II, S. 73.

Fischer und Jennings¹⁾ das Resorcinderivat dargestellt und dieses mit Fehling'scher Lösung gekocht. Es zeigte sich auch hier keine Rothfärbung.

Hexakohlehydrate geben bekanntlich bei der Spaltung mit starken Mineralsäuren Huminstoffe und Lävulinsäure. Die ersteren wurden wohl, wie später erörtert werden soll, in reichlichen Mengen erhalten, der Nachweis der Lävulinsäure gelang jedoch auch in einer grösseren Portion der Gallerte (250 g) nach dem Verfahren von Wehmer und Tollens²⁾ nicht.

Sollte der letzte Versuch, mit noch grösseren Mengen unter verschiedenen Bedingungen angestellt, dasselbe negative Resultat ergeben, so wäre wohl der Schluss berechtigt, dass die durch Spaltung mit Schwefelsäure aus dem Colloid entstehende reducirende Substanz weder eine Hexose, noch eine Pentose, noch auch eine Substanz ist, welche bei der hydrolytischen Spaltung derartige Kohlehydrate liefert.

Zu der Ueberzeugung, dass die reducirende Substanz aus dem Colloid kein Traubenzucker sei, war auch Mitjukoff gekommen. Durch Spaltung des Colloids mit Kalilauge wurde nämlich ein Produkt erhalten, welches kein Osazon lieferte und nicht vergohr.

Es war nun zunächst daran zu denken, dass das Colloid vielleicht ein ähnliches Kohlehydratderivat enthalte, wie der Knorpel die Chondroitinschwefelsäure, obwohl auch aus diesem Lävulinsäure bereits dargestellt wurde.³⁾ Zum Nachweise eines solchen Körpers wurden 1 1/2 kg nach dem Verfahren behandelt, welches Schmiedeberg⁴⁾ zur Darstellung der Chondroitinschwefelsäure eingeschlagen hatte.

Die Gallerte wurde nämlich mit 2⁰/₁₀₀ iger Salzsäure wiederholt gewaschen, mit Pepsin und 4⁰/₁₀₀ iger Salzsäure durch 48 Stunden bei 38° C. verdaut, wobei eine dickliche schleimige

¹⁾ Tollens, Handbuch der Kohlehydrate, II, S. 100.

²⁾ Tollens, Handbuch der Kohlehydrate, II, S. 51.

³⁾ Wehmer und Tollens, Die Bildung von Lävulinsäure, eine Reaction aller wahren Kohlehydrate. Liebig's Annal. 243, S. 315.

⁴⁾ O. Schmiedeberg, Ueber die chemische Zusammensetzung des Knorpels. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 28, S. 355—404.

Flüssigkeit entstand, die beim Verdünnen mit Wasser zwar keine Gallerte absetzte, aber mit Alkohol eine Fällung gab, welche nach längerer Behandlung mit Alkohol in Wasser sich nur zum geringen Theile löste. Das in Wasser unlöslich Gebliebene wurde, nachdem es mit Wasser wiederholt gewaschen war, mit 2%iger Salzsäure extrahirt und die durch Filtration gewonnene klare Flüssigkeit mit Alkohol und Aether gefällt, der Niederschlag mit Alkohol von steigender Concentration behandelt, bis er zu farblosen, harten, bröckligen Massen geworden war, welche dann mit Wasser chlorfrei gewaschen werden konnten.

Diese wurden hierauf in Kalilauge gelöst und mit dem dreifachen Volumen Alkohol gefüllt. Das Lösen und Füllen wurde so oft wiederholt, bis eine Probe des Niederschlages keine Biuretreaction mehr zeigte. Es blieb dann nach dem Trocknen eine ziemlich ansehnliche Menge eines weissen Pulvers.

Eine Probe desselben wurde mit verdünnter Salzsäure 1 Stunde lang gekocht. Das Reaktionsgemisch reducirte beim Kochen Fehling'sche Lösung sofort, während das Pulver erst nach längerem Sieden Kupferoxydul daraus abschied, und gab mit Chlorbaryum einen weissen Niederschlag. Die wässrige Lösung des Pulvers hingegen blieb auf Zusatz von Chlorbaryum klar.

Wiederholte Versuche, nach der Methode von Schmiedeberg zu einem ähnlichen Endprodukte zu gelangen, wie das Chondrosin, förderten nur eine ganz winzige Menge einer klebrigen Substanz zu Tage, deren wässrige Lösung Reduction und Rechtsdrehung zeigte, aber nicht die von Schmiedeberg als charakteristisch angegebene Barytreaction gab.

Die Ergebnisse dieser Versuche führen zu dem Schlusse, dass die reducirende Substanz in Form einer Aetherschwefelsäure im Colloid enthalten ist, deren Kupfersalz auch dargestellt wurde. Dasselbe stellt ein hellblaues Pulver mit einem Kupfergehalte von 9,7% dar (0,1176 g trockenes Salz gaben 0,0142 g Kupferoxyd). Dieser Kupfergehalt stimmt wohl mit dem des chondroitinschwefelsauren Kupfers (im Mittel 9,63%) überein. Nichtsdestoweniger ist es nach den im Vorstehenden beschrie-

benen Versuchen unwahrscheinlich, dass die genannte Säure vorliegt. Es wäre vielmehr nur eine ähnliche Verbindung zu vermuthen. Sobald mir genügendes Material zur Verfügung steht, will ich die Versuche in der angegebenen Richtung fortsetzen und auch zu entscheiden trachten, ob alle reducirende Substanz in Form einer Aetherschwefelsäure im Colloid enthalten ist.

Untersuchung des Eiweisskörpers.

Wie schon früher erwähnt, schied die Lösung der mit verdünnter Schwefelsäure zerkochten Substanz bei der Dialyse reichliche braune Flocken aus. Diese wurden auf einem Filter gesammelt und mit Wasser gewaschen. Beim Trocknen buken sie zu einer gummiartigen, braunen, amorphen Masse zusammen, welche in Wasser unlöslich war, wohl aber in verdünnter Lauge sich löste.

Diese Lösung wurde gefällt durch kleine Mengen von Essigsäure, Schwefelsäure oder Salpetersäure, der Niederschlag löste sich aber im Ueberschusse der Säuren wieder. Sie wurde ferner gefällt durch ein gleiches Volumen einer gesättigten Lösung von schwefelsaurem Ammonium oder schwefelsaurem Magnesium, durch Chlornatrium bis zur Sättigung eingetragen, während Sättigung mit schwefelsaurem Natrium nur spärliche Flocken abschied, ferner durch Alkohol, Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure, in der angesäuerten Lösung durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid, Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium und Gerbsäure. Die Substanz selbst gab Millon'sche und Xanthoproteinsäurereaction, nicht aber die Molisch'sche, Adamkiewicz'sche und Liebermann'sche Reaction. Sie reducirte alkalische Kupferlösung nicht.

Nach alledem wäre dieses Spaltungsprodukt als ein Albuminat zu betrachten. Obwohl es stark mit färbenden Stoffen verunreinigt war, wurde es doch einer Elementaranalyse unterworfen. Diese ergab Folgendes:

I. 0,8016 g Substanz hinterliessen nach dem Glühen

0,0251 g Asche, bestehend aus Sulfaten und Oxyden von Calcium und Magnesium.

II. 0,2085 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem chromsauren Blei, Kupfer und Kupferoxyd 0,1200 g Wasser, entsprechend 0,0135 g Wasserstoff und 0,3720 g Kohlensäure, entsprechend 0,1015 g Kohlenstoff.

III. 0,2342 g Substanz, ebenso verbrannt, gaben 0,1347 g Wasser, entsprechend 0,0151 g Wasserstoff und 0,4165 g Kohlensäure, entsprechend 0,1136 g Kohlenstoff.

IV. 0,2046 g Substanz gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas-Ludwig 18,1 ccm. Stickstoff bei 14,0° C. und 746,5 mm. Barometerstand.

V. 0,2166 g Substanz, ebenso behandelt, gaben 18,8 ccm. Stickstoff bei 13,1° C. und 747,5 mm. Barometerstand.

VI. 0,1773 g Substanz gaben bei der Schwefelbestimmung nach Carins 0,0126 g schwefelsaures Baryum, entsprechend 0,0017 g Schwefel.

VII. 0,1717 g Substanz, ebenso behandelt, gaben 0,0092 g schwefelsaures Baryum, entsprechend 0,0013 g Schwefel.

In Procenten ausgedrückt:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	Mittel
C	—	48,60	48,50	—	—	—	—	48,55
H	—	6,45	6,45	—	—	—	—	6,45
N	—	—	—	10,38	10,23	—	—	10,30
S	—	—	—	—	—	0,97	0,73	0,85
Asche	3,13	—	—	—	—	—	—	3,13

Auf aschefreie Substanz berechnet, ergeben sich folgende Mittelwerthe:

50,11% C, 6,66% H, 10,63% N, 0,88% S, 31,72% O.

Zur näheren Charakterisirung des Eiweisscomplexes wurde eine Spaltung des Colloids mit concentrirter Salzsäure vorgenommen. 1 kg Gallerte wurde mit 3 kg reiner rauchender Salzsäure nach Zusatz von Zinnchlorür durch 5 Stunden, unter Anwendung eines Rückflusskühlers gekocht. Dabei schieden sich reichliche Mengen von unlöslichen, schwarzen Massen ab, welche nach dem Erkalten der Flüssigkeit abfiltrirt und mit Wasser gewaschen wurden, bis das Waschwasser farblos durch-

lief. Dieser ungelöste Antheil, nach dem Trocknen auf dem Wasserbade zerrieben und mit Aether extrahirt, gab an den Aether 0,67 g eines Gemenges ab, in welchem Fettsäuren und Cholesterin nachgewiesen wurden, und stellte darnach ein braunes Pulver dar, welches sich durch erschöpfendes Ausziehen mit reiner verdünnter Natronlauge in zwei Portionen theilen liess.

Die von der Lange ungelöst gebliebene, an Menge gering wurde mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagirte, auf dem Wasserbade getrocknet und der Elementaranalyse unterworfen. Dieselbe ergab Folgendes:

Die Substanz ist frei von Zinn, enthält jedoch Schwefel.

I. 0,1904 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem chromsauren Blei, Kupfer und Kupferoxyd 0,0168 g Asche, 0,0707 g Wasser, entsprechend 0,0079 g Wasserstoff und 0,4457 g Kohlensäure, entsprechend 0,1215 g Kohlenstoff.

II. 0,1742 g Substanz gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas-Ludwig 3,9 ccm. Stickstoff bei 10,0° C. und 748,0 mm. Barometerstand.

In Procenten:

	I	II	auf aschefreie Substanz berechnet
C	63,8	—	70,00
H	4,17	—	4,57
N	—	2,67	2,93
S + O	—	—	22,50
Asche	8,9	—	—
			<hr/> 100,00

Der in verdünnter Natronlauge gelöste Antheil wurde aus seiner Lösung durch Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure gefällt und mit Wasser schwefelsäurefrei gewaschen. Nach dem Trocknen hinterblieb eine braune, leicht zu einem feinen Pulver zerreibliche Masse, welche frei von Schwefel und Phosphor war und beim Erhitzen bis auf eine winzige Menge Asche verbrannte. Die Elementaranalyse ergab:

I. 0,1812 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem Kupferoxyd und Kupfer 0,0708 g Wasser, entsprechend 0,0079 g Wasserstoff und 0,3952 g Kohlensäure, entsprechend 0,1078 g Kohlenstoff.

II. 0,4334 g Substanz gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas-Ludwig 18,5 ccm. Stickstoff bei 12,1° C. und 751,5 mm. Barometerstand.

In Procenten ausgedrückt:

59,52 % C, 4,36 % H, 3,32 % N, 32,80 % O.

Von diesen beiden Fractionen, besonders von der ersten, kohlenstoffreicheren kann selbstverständlich nicht behauptet werden, dass sie chemische Individuen sind. Ihrer Entstehungsweise, ihren Eigenschaften und ihrer chemischen Zusammensetzung nach kommen sie jedoch einerseits den durch Kochen mit Säuren aus Kohlehydraten entstehenden Huminstoffen, anderseits den von Schmiedeberg¹⁾ durch Spaltung von Eiweisskörpern auf demselben Wege erhaltenen Melanoidsäuren nahe. Allerdings ist es noch nicht klargestellt, ob die Melanoidsäuren nicht die aus dem Kohlehydratcomplex der Eiweisskörper entstandenen Huminsubstanzen repräsentiren. Die grosse Menge der aus dem Colloid entstandenen schwarzen Produkte würde dann nicht anders zu deuten sein, als dass im Colloid im Vergleich zu den Amidverbindungen bedeutend mehr kohlehydratähnliche Gruppen enthalten sind, als in anderen Eiweisskörpern. Der verschiedene Stickstoffgehalt spielt nur eine geringe Rolle, da Huminstoffe nach den Untersuchungen von Berthelot und André²⁾ Ammoniak aufnehmen und zu Amidverbindungen binden.

Zur bequemerem Uebersicht soll eine Zusammenstellung der oben angeführten Werthe, der Schmiedeberg'schen Melanoidsäuren und der aus Traubenzucker gewonnenen Huminsäuren nach Berthelot und André folgen:

In Procenten:

Huminstoffe aus Traubenzucker:

	C	H	N	S	O
berechnet für $C_{18}H_{14}O_6$	66.24	4.30	—	—	29.44
berechnet für $C_{18}H_{14}O_6 + H_2O$	62.80	4.64	—	—	32.56

1) O. Schmiedeberg, Elementarformeln einiger Eiweisskörper und Melanine. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmac., Bd. 39. S. 1.

2) Berthelot u. André, Recherches sur les substances humiques. Compt. rend., Bd. 112, S. 916.

Huminstoffe aus dem Colloid:

	C	H	N	S	O
in Natronlauge unlöslich	70.00	4,57	2,93	—	22.50
in Natronlauge löslich	59.52	4.36	3,32	—	32.80

Melanoidsäuren:

	C	H	N	S	O
aus Wittes Pepton	60.34	4.86	8,09	0.96	—
aus Serumalbumin	66.27	5.49	5,57	—	—

Die von den schwarzen Massen abfiltrirte Flüssigkeit wurde nach dem Verdünnen mit Wasser wiederholt mit Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Auszüge hinterliessen nach dem Abdestilliren des Aethers nur eine geringe Menge Rückstand (0,16 g), welcher an Wasser nichts abgab. Es hatte sich also auch hier keine Lävulinsäure gebildet. Unwahrscheinlich ist auch die Anwesenheit von aromatischen Oxyssäuren. Dagegen konnten darin Cholesterin und Fettsäuren nachgewiesen werden.

Die wässrige Flüssigkeit wurde nach dem Abdunsten des gelösten Aethers mit Schwefelwasserstoff behandelt und von dem abgeschiedenen Schwefelzinn abfiltrirt. Der Niederschlag wurde noch wiederholt mit Wasser ausgekocht und die Waschwässer mit der übrigen Flüssigkeit vereinigt. Nachdem daraus der Schwefelwasserstoff durch Kochen vertrieben war, wurde die Lösung noch warm mit einer heiss gesättigten Lösung von Phosphorwolframsäure versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Es schied sich nur wenig Niederschlag aus, welcher abfiltrirt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und mit Baryt zerlegt wurde. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde nun nach dem von Kossel¹⁾ ausgearbeiteten Verfahren nacheinander mit Sublimat, schwefelsaurem Silber und Natriumpikrat gefällt und die einzelnen Niederschläge in der entsprechenden Weise zerlegt. Jede der drei Fractionen lieferte endlich nur eine winzige Menge von stickstoffhaltigen Kryställchen, die letzte, welche das Lysin enthalten soll, relativ am meisten. Diese wurde daher in das Platindoppelsalz übergeführt, durch wiederholtes Umkrystallisiren gereinigt und, nur um grobe

¹⁾ A. Kossel, Ueber die Constitution der einfachsten Eiweissstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, Heft 3 u. 4.

Verwechslungen (z. B. mit Platinsalmiak) hintanzuhalten, eine Platinbestimmung versucht, welche bei der winzigen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz nur ein annäherndes Resultat geben konnte.

0,0025 g des trockenen Salzes hinterliessen beim Veraschen 0,0009 g Platin, entsprechend 39%, während Lysinplatinchlorid 35,05% und Ammoniumplatinchlorid 43,9% Platin erfordert.

Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass hier kleine Mengen von Hexonbasen vorlagen.

Das Filtrat von dem durch Phosphorwolframsäure entstandenen Niederschlage wurde heiss mit Baryt alkalisch gemacht, filtrirt und das Filtrat mit Schwefelsäure unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses gefällt. Die vom schwefelsauren Baryum abfiltrirte und auf ca. 300 ccm. eingengte Lösung wurde mit Chlorbaryum genau ausgefällt, filtrirt, das Filtrat nach weiterem Einengen auf ca. 100 ccm. mit Salzsäuregas gesättigt und zum Syrup eingedampft. Dieser blieb dann im Eiskasten einen Monat lang stehen. Es schieden sich wohl Krystalle aus, welche jedoch nach dem Absaugen auf porösen Thonplatten und Reinigen sich als vollkommen anorganisch und zwar der Hauptmenge nach als Kochsalz erwiesen. Salzsäure Glutaminsäure wurde demnach nicht erhalten.

Die mit Wasser verdünnten Mutterlaugen wurden nun durch Silberoxyd von der Salzsäure und durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, wobei die Filtrationen immer unter Anwendung eines Wärmtrichters vorgenommen und die Niederschläge wiederholt mit Wasser ausgekocht wurden. Filtrat und Waschwasser wurden dann zur Krystallisation eingedampft, die Krystalle abgesaugt und die Mutterlauge so oft weiter eingengt, als sich noch Krystalle ausschieden. Die gesammelten Krystalle, deren Lösung (vielleicht nur in Folge der anhaftenden Mutterlauge) nur schwache Millon'sche Reaction gab, wurden nach dem von Hlasiwetz und Habermann zur Trennung von Leucin und Tyrosin angegebenen Verfahren behandelt, wobei kein Tyrosin, wohl aber ansehn-

liche Mengen von Leucin erhalten wurden. Das letztere wurde aus heissem ca. 20%igen Alkohol mehrere Male umkrystallisirt und stellte zuletzt eine aus grösseren Blättchen bestehende farblose Krystallmasse dar, welche beim Erhitzen sublimirte und die Scherer'sche Reaction zeigte.

Eine Stickstoffbestimmung daraus nach Dumas-Ludwig ergab folgendes Resultat:

0,0788 g Substanz gaben 7,3 ccm. Stickstoff bei 14,4° C. und 742 mm. Barometerstand.

Berechnet für $C_6H_{12}NO_2$	10,70% N
Gefunden	10,79% N

Das daraus dargestellte Kupfersalz zeigte folgende Zusammensetzung:

0,1188 g Substanz gaben bei der Verbrennung mit vorgelegtem Kupferoxyd und metallischem Kupfer 0,0291 g Kupferoxyd, entsprechend 0,0232 g Kupfer, 0,0738 g Wasser, entsprechend 0,0088 g Wasserstoff und 0,1938 g Kohlensäure entsprechend 0,0529 g Kohlenstoff.

In Procenten:	Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$	Gefunden
C	44,58	44,49
H	7,43	7,39
Cu	19,60	19,57

Die Mutterlaugen nach dem Leucin schieden bei der Behandlung mit Bleiessig, sowie mit Kupferhydroxyd und Bleiessig keine Asparaginsäureverbindung ab. Ebenso wenig konnte mit Hilfe von Quecksilbersalzen Glutaminsäure gewonnen werden. Die wässrige Lösung der Mutterlauge zeigte zwar schwache Millon'sche Reaction, doch konnte der dieselbe verursachende Körper nicht dargestellt werden.

Ein zweiter Spaltungsversuch mit vorher getrockneter Substanz, rauchender Salzsäure und Zinnchlorür, nur zu dem Zwecke unternommen, um bei dem ersten etwa übersehene Spuren von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Tyrosin nachzuweisen, weshalb die Fällung mit Phosphorwolframsäure sammt den dadurch bedingten Operationen wegblieb, ergab bezüglich der drei genannten Körper dasselbe negative Resultat.

Es sei nur noch erwähnt, dass beim Kochen des Colloids mit concentrirter Barytlösung reichliche Mengen Ammoniak, sowie ein aus rothen Flocken bestehender Körper von eigenthümlichem Geruche (vielleicht Pyrrolroth?) abdestillirten.

Als sichere organische Spaltungsprodukte wurden also nach dem Kochen mit concentrirten Säuren und Alkalien nachgewiesen: Ammoniak, Leucin und Huminstoffe, mit Wahrscheinlichkeit Hexonbasen in Spuren.

Weitere Untersuchungen, welche, sobald mir genügendes Material zur Verfügung steht, werden unternommen werden, sollen über die Natur des die Millon'sche Reaction gebenden Spaltungsproduktes Aufschluss geben. Bei der grossen Empfindlichkeit dieser Reaction ist es nicht unmöglich, dass dieser Körper Tyrosin in geringen Mengen ist, welche bei dem umständlichen Trennungsv erfahren leicht in den anorganischen Niederschlägen bleiben können. Da die Spuren von Fettsäuren, Cholesterin und Basen mit Wahrscheinlichkeit nur auf Verunreinigungen zu beziehen sind und dasselbe bei den etwaigen Spuren von Tyrosin der Fall sein dürfte, so würde dann das Colloid eine oder vielleicht ein Gemenge von Verbindungen eines Kohlehydratderivates mit Eiweisskörpern repräsentiren, welch letztere durch grosse Einfachheit allerdings in anderem Sinne als die Protamine ausgezeichnet sind.

Soll zum Schlusse noch das Eierstockscolloid mit ähnlichen Körpern anderer Herkunft verglichen werden, so scheint dasselbe von dem Schilddrüsencolloid weit verschieden zu sein, da das letztere nach neueren Untersuchungen das jodhaltige Jodothyryn enthält, während jenes frei von Jod ist. Dagegen zeigen manche Gallertcarcinome, wie sie von Würtz, Virchow, Mulder, Buhl u. A. untersucht wurden, wenigstens den Löslichkeitsverhältnissen und dem Verhalten gegen alkalische Kupferlösung nach grosse Aehnlichkeit.

Ueber das Histidin.

Von

A. Kossel und Fr. Kutscher.

Mit zwei Abbildungen.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

I. Ueber das optische Drehungsvermögen des Histidins.

Von A. Kossel.¹⁾

Nach meinen früheren Untersuchungen ist es möglich, Arginin und Histidin zusammen in Form der Silberverbindungen aus einem Gemisch von Zersetzungsprodukten der Eiweisskörper quantitativ auszufällen, hingegen bietet die Trennung dieser beiden Hexonbasen von einander einige Schwierigkeiten. Wäre das Histidin, wie Hedin angibt,²⁾ optisch inactiv, so würde diese Trennung bei der quantitativen Bestimmung zu umgehen sein, indem sich dann das rechtsdrehende Arginin neben dem Histidin polarimetrisch bestimmen liesse. Ich habe daher die Angabe Hedin's einer Nachprüfung unterworfen. Meine Untersuchungen, die in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt sind, führen zu dem Resultat, dass das Histidin, ebenso wie die anderen Hexonbasen, in der wässrigen Lösung sowohl als Chlorid, wie als freie Base optisch activ ist.

Moleküle HCl auf 1 Molekül Histidin	l	c	α_D	[α] _D		
				für $C_6H_9N_3O_2$	für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl$	für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$
0	6	3,183	— 7,59	— 39,74	—	—
1	4	2,594	+ 0,18	+ 2,14	+ 1,74	—
2	6	4,828	+ 1,54	+ 7,82	—	+ 5,32
4	6	3,38	+ 1,31	+ 9,49	—	+ 6,46

Nach diesen Zahlen sind die optischen Verhältnisse des Histidins eigenartige. Das Histidin gehört zu jener nicht sehr zahlreichen Gruppe von Basen, die in freiem Zustande linksdrehend, als Salze rechtsdrehend sind. Es verhält sich in dieser Hinsicht wie das Nicotin. Ausserdem zeigt sich, dass

¹⁾ Vorläufig mitgetheilt in den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Förderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg. Juni 1899.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 193.

durch Zusatz von Salzsäure zur Lösung des Monochlorids und Dichlorids die Drehung erhöht wird. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zu beziehen, dass bei kleineren Säuremengen eine theilweise hydrolytische Dissociation vorhanden ist. Ob bei Gegenwart von 4 Molekülen Salzsäure schon das Maximum der Drehung erreicht ist, lässt sich nicht beurtheilen.

Die Dissociation ist beim Monochlorid so bedeutend, dass $[\alpha]_D$ hier einen sehr niedrigen Werth hat. Hieraus ist auch wohl die Angabe Hedin's über die Inactivität des Histidinchlorids zu erklären. Hedin beschreibt in seiner Abhandlung nur das Monochlorid und hat offenbar auch dieses Salz für die optische Untersuchung verwendet. Bei Benutzung weniger feiner Instrumente kann das Drehungsvermögen der Lösung dieses Salzes der Beobachtung entgehen, erreicht doch die Drehung einer Lösung von 2,5% des Monochlorids bei einer Rohrlänge von 20 cm. nicht $0,1^\circ$.

Dass ein Unterschied zwischen dem Histidin Hedin's und dem meinigen besteht, ist nach den Resultaten der Analysen und der krystallographischen Untersuchungen nicht anzunehmen. Ich will bemerken, dass ich auch bei der Untersuchung des Molekulargewichts durch die Feststellung der Siedepunkterhöhung in wässriger Lösung dieselben Zahlen fand, wie Hedin. Die Untersuchung meines Präparats führte zu den Zahlen 156,3 und 156,6, während Hedin 155,4 fand; berechnet ist: 155.

Fernerhin sei bemerkt, dass das Histidin mit Salpetersäure ein gut krystallisirendes Nitrat von der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HNO_3$ und ebenso gut krystallisirende Doppelsalze mit Platinchlorid und Silbernitrat bildet. Die genauere Untersuchung dieser Salze ist noch nicht beendet, da die Beschaffung der genügenden Substanzmengen auf Schwierigkeiten stiess.

II. Ueber Histidindichlorid.

Von Fr. Kutscher.

Im Laufe meiner ersten Untersuchung über das «Antipepton»¹⁾ isolirte ich aus der Histidinfraction ein Salz, das

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 195.

sich mit seinem Chlorgehalt einem Histidindichlorid der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl$ näherte. Es gelang mir damals nicht, die verlangte Chlormenge in das Salz einzuführen, und ich musste es schliesslich, um es als eine salzsaure Histidinverbindung zu identificiren, in die von Hedin¹⁾ beschriebene Histidinsilberverbindung überführen. In der Folge vermochte ich jedoch eine Methode auszuarbeiten, welche mir Präparate mit dem verlangten Chlorwerth lieferte. Ich benutzte dabei salzsaure Histidinverbindungen, die ich aus den Spaltungsprodukten der Handelsgelatine²⁾ gewonnen hatte und welche nur einen Chlorwerth von ca. 27% besaßen.

Dieselben wurden in heisser concentrirter Salzsäure von 1,19 spec. Gewicht gelöst, die Salzsäure im Exsiccator langsam verdunstet und die ausgeschiedenen Krystalle noch zwei- bis dreimal der gleichen Behandlung unterworfen. Schliesslich wurden sie mit verdünnter Salzsäure, in der sie weit löslicher wie in concentrirter sind, aufgenommen und im Exsiccator zur Krystallisation aufgestellt. Es schieden sich jetzt beim allmählichen Verdunsten der Salzsäure grosse glashelle Tafeln aus. Die so gewonnenen mit Alkoholäther gewaschenen Krystalle gaben über Schwefelsäure getrocknet nachstehende Analysenwerthe:

0,157 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,1817 g Kohlensäure und 0,0726 g Wasser.

0,1528 g Substanz lieferten bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung bei 17° C. und 748 mm. Barometerstand 24,6 ccm. Stickstoff. Als Sperrflüssigkeit diente ca. 25%ige Kalilauge.

0,1864 g Substanz gaben 0,234 g AgCl.

Berechnet:	Für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl$	Gefunden:
C = 31,58%		C = 31,57%
H = 4,82%		H = 5,17%
N = 18,42%		N = 18,49%
Cl = 31,14%		Cl = 31,04%

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 191.

2) Ob das aus der Gelatine gewonnene Histidin als Spaltungsprodukt der Gelatine aufzufassen ist, oder aus dem der Handelsgelatine beigemengten Eiweiss herrührt, will ich vor der Hand dahingestellt sein lassen. Die Ausbeute war jedenfalls eine sehr geringe; so vermochte ich z. B. aus 100 g reiner Handelsgelatine nur ca. 0,4 g Histidindichlorid

Das Histidindichlorid besitzt im Gegensatz zum Histidinmonochlorid kein Krystallwasser. Man kann daher seine über Schwefelsäure getrockneten Krystalle auf 140° C. erhitzen, ohne eine Gewichtsabnahme derselben zu bemerken.

Im Schmelzröhrchen sintert das Histidindichlorid bei ca. 225° C. und schmilzt unter Zersetzung (unter Abgabe von Ammoniumchlorid*) bei $231-233^{\circ}$ C.

Später zog ich es vor, das Histidindichlorid derart darzustellen, dass ich es in wenig heisser Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 löste, es mit Alkoholäther fällte, die geschilderte Operation an den abgeschiedenen Krystallen mehrmals wiederholte, dieselben schliesslich mit verdünnter Salzsäure aufnahm und daraus langsam auskrystallisiren liess. Auf diese Weise wurde das Präparat gewonnen, an dem Herr Professor Kossel die oben angeführte Untersuchung über die specifische Drehung des Histidindichlorids gemacht hat. Das gleiche Präparat wurde von Herrn Dr. Schwantke zur Bestimmung der Krystallform des Histidindichlorids benutzt. Als Ausgangsmaterial zu seiner Gewinnung hatte das «Antipepton Balke's»¹⁾ und das «Drüsenpepton» Kühne's²⁾ gedient.

zu isoliren. Siehe über den gleichen Punkt Kossel's Abhandlung «Les Protamines et les Corps Albuminoïdes» in der Revue générale des sciences. Jahrg. 1899, Nr. 10, S. 380.

*) In einem grösseren Versuch erhitzte ich, um vom Histidindichlorid zum Histidinmonochlorid zu gelangen, 0,3874 g Histidindichlorid im Fractionirkölbchen längere Zeit im Schwefelsäurebad auf 140° C. Die abgespaltene Salzsäure trieb ich durch trockenen Wasserstoff in vorgelegte reine Natronlauge. Nach der Beendigung des Versuches fand sich jedoch im Halse des Fractionirkölbchens ein Sublimat, das mit Platinchlorid charakteristisches Ammoniumplatinchlorid lieferte. Der im Kölbchen verbliebene stark gefärbte Rückstand gab nach der Behandlung mit Thierkohle eine kleine Menge krystallisirender Substanz, die aber kein Histidinmonochlorid zu sein schien. Es hatte also schon bei 140° C. eine starke Zersetzung des Histidindichlorids stattgefunden, während der Schmelzpunkt des Histidinmonochlorids nach Kossel³⁾ erst bei $151-152^{\circ}$ C. gelegen ist.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 110.

2) Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Habilitationsschrift.

3) Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 192.

Bei der Chlorbestimmung lieferten 0,1668 g des Präparates 0,2115 g AgCl.

Für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl$

Berechnet
Cl = 31,14 %

Gefunden
Cl = 31,35 %

Herr Dr. Schwantke, Assistent am mineralogischen Institut hieselbst, hatte die Güte, uns folgende Mittheilungen über die krystallographischen Verhältnisse des Histidindichlorids zukommen zu lassen, wofür wir ihm unsern besten Dank abstatten.

Krystallsystem rhombisch holoeidrisch.

Beobachtete Formen:

o = oP (001)
l = $\frac{1}{2} P\infty$ (102)
n = $P\infty$ (101)
d = $\frac{1}{2} P\infty$ (012)
s = ∞P (110)
p = P (111)

Die Krystalle sind tafelig nach o.

Aus den Winkeln l:l und d:d ergab sich das Achsenverhältniss:

		Histidin-Chlorhydrat
a	0,76537	0,76665
b	1	1
c	1,77516	1,71104

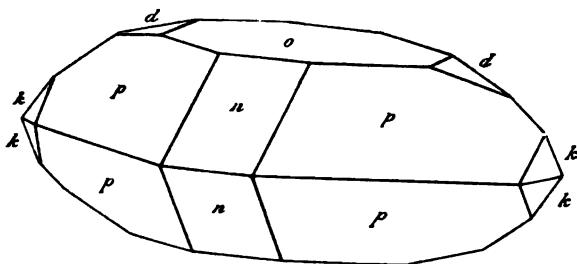
Winkeltabelle (Normalenwinkel):

Winkel	Gemessen	Berechnet	Histidin-Chlorhydrat, ber. M. Bauer
d:d = 012:012	* 96° 49'	—	98° 54'
l:l = 102:102	* 81° 31'	—	—
n:n = 101:101	46° 52'	46° 38 $\frac{3}{4}$ '	48° 16'
p:o = 111:001	71° 07'	71° 06'	70° 25 $\frac{1}{2}$ '
p:p = 111:111	38° 05'	37° 48'	39° 09'
p:p = 111:111	—	70° 12'	69° 57'
p:p = 111:111	—	99° 24 $\frac{1}{2}$ '	96° 48'
p:d = 111:012	51° 10'	51° 23 $\frac{3}{8}$ '	—
p:n = 111:101	56° 11'	55° 49 $\frac{3}{4}$ '	—
p:n = 111:101	—	33° 06'	34° 58'
n:o = 101:001	—	66° 40 $\frac{1}{2}$ '	65° 52'
d:o = 012:001	41° 26'	41° 35 $\frac{1}{2}$ '	40° 33'
l:n = 102:101	17° 15'	17° 26'	—
l:o = 102:001	49° 34'	49° 18 $\frac{1}{2}$ '	—

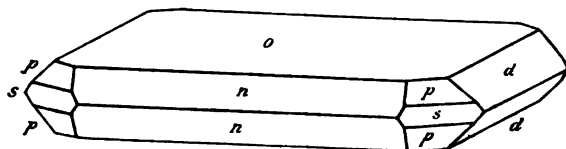
Ebene der optischen Axen 010, erste Mittellinie b, grosser Axenwinkel.

Wenn auch die Messungen an 6 gemessenen Krystallen in Folge der schlechten Signale nur eine mässige Genauigkeit besitzen, so waren doch die gemessenen Differenzen geringer als die Differenz mit den am Histidin-Chlorhydrat gemessenen Winkeln. Beide Substanzen stehen also im Verhältniss der Morphotropie (die sich wesentlich auf die c-Axe erstrecken dürfte), worauf auch die abweichende optische Beschaffenheit hinweist.

Figur 1.



Figur 2.



(Erste Mittellinie beim Histidin-Chlorhydrat c, auch stärkere Doppelbrechung). Die Verschiedenheit des Habitus der Krystalle beider Substanzen ist aus der beistehenden Figur ersichtlich. Figur 1 stellt ein Krystall des Histidin-Chlorhydrats nach M. Bauer (Zeitschr. für physiolog. Chemie, Bd. XXII, S. 182) dar. In der Krystallform des Dichlorids, Figur 2, wurde der grösseren Deutlichkeit halber die schmale Fläche l (102) fortgelassen.

Eine Hemiedrie der Formen wurde nicht beobachtet; die Aetzfiguren auf o sind viereckige symmetrische Grübchen mit den Kanten 11a und b.

Ueber die Spaltungsprodukte des Histons von Leucocyten.

Von

Dr. D. Lawrow.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 31. Juli 1899.)

Die Histone bilden eine Gruppe von Eiweisskörpern, welche trotz ihrer grossen Verbreitung und trotz ihres principiellen Interesses für die chemische Kenntniss der Eiweisskörper noch wenig erforscht sind. Eine scharfe Charakterisirung dieser Stoffe gegenüber anderen Eiweisskörpern ist im Wesentlichen von dem Studium ihrer Spaltungsprodukte zu erwarten. Dieses Studium muss uns Aufklärung darüber verschaffen, inwiefern den eigenthümlichen äusserlichen Merkmalen der Histone eine Besonderheit in ihrer Constitution entspricht. Abgesehen von einigen vorläufigen Angaben fehlen uns Untersuchungen in dieser Richtung. Zunächst wäre es lehrreich, diejenigen Spaltungsprodukte der Histone zu kennen, welche aus den einfachsten Eiweisskörpern, den Protaminen, in der grössten Menge hervorgehen — die Hexonbasen.¹⁾ Sollen doch nach den Angaben von A. Kossel diese bei den Histonen reichlicher vertreten sein, als bei den übrigen Eiweisssubstanzen.

Darum bin ich bereitwillig auf den Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel eingegangen, die Hexonbasen des Histons von Leucocyten zu untersuchen.

Hierfür benutzte ich das aus Thymusdrüsen nach A. Kossel's Methode dargestellte Histon. Die frischen, fein zer-

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 165—189.

hackten Thymusdrüsen wurden mit Wasser und Chloroform 24 Stunden bei Zimmertemperatur digerirt, sodann colirt und das Filtrat mit Essigsäure unter Vermeidung eines Ueberschusses gefällt. Der erhaltene Niederschlag des Nucleohistons wurde abgetrennt, abgepresst und mit verdünnter Salzsäure (0,8%) in Gegenwart von Chloroform bei Zimmertemperatur etwa 12—16 Stunden extrahirt. Der abgetrennten Lösung wurde 95%iger Alkohol — $\frac{1}{2}$ Volumen — und Ammoniak hinzugefügt, solange noch ein Niederschlag entstand. Der nach 2—3 Stunden abgesaugte Niederschlag wurde mit Filtrirpapier sorgfältig abgepresst und zuerst auf dem Wasserbade, endlich bei 100—105° ganz getrocknet.

Auf diese Weise habe ich aus etwa 28 kg Thymusdrüsen ungefähr 475 g bei 100—105° getrocknetes Histon dargestellt. Dieses Histon gab die Reaction von Adamkiewicz und färbte sich mit Millon's Reagens, doch schwächer, als z. B. das Eieralbumin. Beim Kochen mit starker Kalilauge und Bleiessig zeigte es gar keine schwarze Färbung.

Die Reinigung dieses Histons durch eine wiederholte Auflösung in verdünnter Schwefelsäure (oder Chlorwasserstoffsäure) und Fällung mit Ammoniak in Gegenwart von Alkohol stiess auf grosse Schwierigkeiten, weil es sich zeigte, dass die Löslichkeit des Histons in überschüssigem Ammoniak immer mehr zunahm.

Das getrocknete Histon wurde durch Kochen mit Salzsäure in Gegenwart von Zinn gespaltet. Auf je 100 g Substanz kamen 10 g Zinn und 650 ccm. (20%) Salzsäure. Die Mischung wurde zuerst in einem Kolben mit Rückflusskühler auf kochendem Wasserbade bis zur Auflösung des Eiweisses erhitzt, darauf auf dem Sandbade 72 Stunden ununterbrochen gekocht. Der Rückflusskühler wurde mit einem langen Capillarröhrchen verschlossen. Die Lösung der Zersetzungsprodukte wurde nach der Entfernung des Zinns durch Schwefelwasserstoff mit Wasser auf das Fünffache verdünnt, durch Schwefelsäure angesäuert, so dass der Gehalt an derselben 5% betrug, und durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der abgesaugte Niederschlag wurde dreimal mit 5%iger Schwefelsäure sorgfältig ausgewaschen und jedesmal abgepresst. Darauf wurde

er mit Wasser gemischt und bei 60—65° durch Barythydrat zerlegt. Der Niederschlag wurde zweimal mit heissem Wasser ausgewaschen und durch die vereinigten Filtrate Kohlensäure hindurchgeleitet. Der Gehalt der nach Abdampfen und Filtriren gewonnenen Lösung an organischen Substanzen betrug etwa 120,6 g; daneben waren 3,5 g anorganische Substanzen vorhanden. Aus dieser Lösung wurden die Hexonbasen nach der von A. Kossel angegebenen Methode isolirt.¹⁾ Der durch Silbernitrat und Baryt erhaltene sehr voluminöse Niederschlag, welcher Histidin und Arginin enthalten musste, wurde nach mehreren Stunden abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgewaschen und mit sehr verdünnter Salpetersäure gelöst. Die filtrirte Lösung wurde abwechselnd mit Ammoniak und Silbernitrat versetzt, solange noch die Bildung eines Niederschlages stattfand. Der nach dieser von Hedin angegebenen Methode²⁾ erhaltene Niederschlag von Histidin wurde abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen und durch sehr verdünnte Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber und durch Barythydrat von Schwefelsäure befreit.

Aus dem Filtrate vom letztgenannten Histidinniederschlage wurde Silber durch Schwefelwasserstoff und eine kleine Menge vom Barythydrat durch Schwefelsäure entfernt.

Der Gehalt der Lösung des rohen Histidins an organischen Substanzen betrug 7,435 g, daneben waren 1,52 g anorganische Stoffe vorhanden.

Der Gehalt der Lösung des rohen Argininnitrats belief sich auf 126,725 g organische und 3,30 g anorganische Stoffe: derselbe der Lösung der anderen Spaltungsprodukte — Lysin-fraction — 46,84 g und 3,18 g.

Somit zeigte sich, dass das Histon der Leucocyten bei Zersetzung durch Chlorwasserstoffsäure alle drei Hexonbasen lieferte, und zwar betrug die Summe derselben ungefähr 25% seines Gewichtes. Der grössere Theil dieser Zersetzungsprodukte fällt auf das Arginin.

1) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, 1. c.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 191—196.

Nach A. Kossel enthält das Histon ungefähr 40% Stickstoff in Form von Hexonbasen.¹⁾

Histidinfraction.

Die nach obigem Verfahren dargestellte Lösung des rohen Histidins wurde durch Thierkohle entfärbt, auf dem Wasserbade eingedampft, mit concentrirter Chlorwasserstoffsäure gemischt, noch weiter bis zur beginnenden Krystallisation eingengt, abgekühlt und mit Alkohol und etwas Aether gemischt, solange noch ein krystallinischer Niederschlag entstand. Derselbe wurde abgesaugt und in gleicher Weise noch zweimal umkrystallisirt. Die Ausbeute betrug 2,6 g. Es zeigte sich, dass die Substanz Baryum enthielt.

0,1459 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Subst. gaben 0,1788 g AgCl
0,1101 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,135 „ AgCl

Gefunden: HCl 31,18%.

Obwohl die Substanz noch einmal umkrystallisirt wurde, blieb doch der Gehalt an Chlorwasserstoffsäure unverändert, auch wurde der Baryumgehalt durch Umkrystallisation nicht entfernt.

0,2914 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Subst. gaben 0,358 g AgCl.

Gefunden: Berechnet für $(C_6H_9N_3O_4 \cdot 2HCl)_2 \cdot BaCl_2 \cdot 2H_2O$:
HCl 31,24% 31,27%.

Sowohl die Analyse des umkrystallisirten Produkts, wie auch die obige Chlorbestimmung in dem ursprünglichen Salz würden mit der Annahme eines Baryumdoppelsalzes wohl zu vereinigen sein.

Dieses Doppelsalz schmilzt bei 219—222° unter Zersetzung.

Nach den Beobachtungen von A. Kossel²⁾ ist das salzsaure Histidin optisch activ. Da diese Angabe nicht mit den Resultaten von Hedin übereinstimmt, ist die Möglichkeit, dass zwei Histidine existiren, in Betracht zu ziehen. Es ist daher von Interesse, das Drehungsvermögen des aus Histon darge-

1) Fr. Müller, Deutsch. med. Wochenschr., 1899, Nr. 13.

2) A. Kossel, Sitzungsberichte der Marburger Gesellschaft für die Beförderung der gesammten Naturwissenschaften vom Juni 1899.

stellten Histidins festzustellen. Die Polarisationsuntersuchung der Substanz wurde mit einem grossen Lippich-Landolt'schen Halbschattenpolarimeter ausgeführt:

Das Resultat der Beobachtung ist folgendes:

$$\begin{aligned} l &= 4 \text{ dm, } t = 20^\circ \text{ C., } p = 1,602, d = 1,0105, (\alpha) = + 0,43^\circ \\ (\alpha)_D^{20} &\text{ für } C_6H_9N_3O_4 \cdot 2HCl = + 6,64 \\ &\text{ „ „ } C_6H_9N_3O_4 = + 9,77 \end{aligned}$$

Diese Zahlen weichen von den Angaben von A. Kossel ab. Es ist aber wohl denkbar, dass diese Differenz auf die Verdünnung der von mir untersuchten Lösung zu beziehen ist.

Argininfraction.

Ein Theil der Lösung des Argininnitrats wurde mit Kupferoxydhydrat gemischt, auf dem Wasserbade erwärmt, filtrirt, abgedampft und über Schwefelsäure stehen gelassen. Der entstandene krystallinische Niederschlag wurde durch viermaliges Umkrystallisiren aus heissem Wasser gereinigt und bis zum constanten Gewicht über Schwefelsäure getrocknet. Die ausgeschiedenen Krystalle bestanden aus einem Salz, dessen Lösung alkalisch reagirte und welches bei der Analyse folgende Werthe ergab:

0,4169 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Substanz verloren bei 105° C. 0,0378 g an Gewicht und gaben beim Glühen 0,0577 g CuO: 0,385 g derselben Substanz nahmen bei 105° C. 0,0366 g an Gewicht ab und lieferten 0,0505 g CuO.

Gefunden: Berechnet für $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$:

H ₂ O	9,49%, 9,07%	9,17%
Cu	10,46%, 11,05%	10,76%

Nach Schulze und Steiger¹⁾ enthält das Argininkupfernitrat, aus etiolirten Lupinenkeimlingen dargestellt, 3 Moleküle Krystallwasser; nach Hedin²⁾ enthält dieses aus Hornsubstanz erhaltene Salz auch 3 Moleküle Krystallwasser. Das aus dem

1) E. Schulze und E. Steiger. Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 43—65.

2) S. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 186—192.

Clupein gewonnene Argininkupfernitrat enthält nach W. Gulewitsch¹⁾ $3\frac{1}{2}$ Moleküle Krystallwasser.

Dieses Salz wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt, und das spezifische Drehungsvermögen des erhaltenen Arginin-nitrats ermittelt.

Die Beobachtung gab folgendes Resultat:

$$l = 4 \text{ dm, } t = 22^{\circ}, p = 6,454, d = 1,0225, \alpha = + 2,50$$

$$(\alpha)_D^{20} \text{ für } C_6H_{14}N_4O_8 \cdot HNO_3 = + 9,47$$

$$, \quad , \quad C_6H_{14}N_4O_8 \quad = + 12,90$$

Diese Zahlen stimmen mit den für das aus Clupein dargestellte Arginnitrat von Gulewitsch gefundenen vollkommen überein.²⁾

Ich habe das spezifische Drehungsvermögen des Arginin-monochlorids ermittelt. Dieses wurde in folgender Weise aus Arginnitrat dargestellt. Eine Lösung von Arginnitrat wurde durch Silbernitrat und Barythydrat in mehrfach erwähnter Weise gefällt; der abgesaugte Niederschlag mehrere Male mit Wasser ausgewaschen und durch Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber, durch Barythydrat von Schwefelsäure befreit, mit Thierkohle entfärbt, durch Chlorwasserstoffsäure ganz genau neutralisirt, verdampft und über Schwefelsäure stehen gelassen, wobei sie krystallisirte. Ich fügte nun Alkohol hinzu, solange sich noch eine Vermehrung des krystallinischen Niederschlags wahrnehmen liess, saugte die Krystalle sodann ab und krystallisirte sie noch zweimal in derselben Weise um.

Das von mir untersuchte Argininchlorid enthielt ein halbes Molekül Krystallwasser. Das von Schulze und Steiger erhaltene Argininchlorid, aus Lupinenkeimlingen dargestellt, enthielt kein Krystallwasser;³⁾ das von Hedin aus Horn gewonnene Salz ein Molekül,³⁾ wie letzteres verhielt sich das von Gulewitsch untersuchte.³⁾

1) W. Gulewitsch, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 178—215.

2) W. Gulewitsch, l. c.

3) l. c.

Die Elementaranalyse der im Vacuumexsiccator getrockneten Substanz gab folgende Resultate:

0,1867 g der Substanz gaben 42,2 ccm. N_2 bei $18^\circ C.$ und 748 mm. Bar.

0,1990 „ „ „ 0,2378 g CO_2 und 0,1346 g H_2O .

0,2590 g verloren bei $135-140^\circ$ 0,009 g an Gewicht.

Gefunden:

Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + \frac{1}{2} H_2O$:

C	32,59%	32,80%
H	7,52%	7,29%
N	25,70%	25,51%
H_2O	3,60%	4,10%

Die Resultate der Polarisationsuntersuchung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Anzahl der Moleküle HCl auf 1 Molekül $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^t$ für	
						$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	$C_6H_{14}N_4O_2$
0	4 dm	22°	7,092	1,0235	+ 2,69	+ 9,27	+ 11,21
4	4 dm	22°	4,625	1,0286	+ 3,63	+ 19,07	+ 23,07

Diese Zahlen sind etwas niedriger, als die von Gulewitsch¹⁾ und von Schulze und Steiger¹⁾ ermittelten. Nachdem F. Kutscher ein neues Arginin aufgefunden hat,²⁾ welches sich von dem bisher bekannten unter Anderem dadurch unterscheidet, dass es optisch inactiv ist, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass dem von mir untersuchten Chlorid eine gewisse Menge des inactiven Arginins beigemischt ist. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung habe ich nicht angestellt.

Lysinfraction.

Die vom Silberniederschlag des Histidins und Arginins abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit dem Waschwasser vereinigt, durch Schwefelsäure vom Baryt, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, eingedampft und nach der Methode von

1) l. c.

2) F. Kutscher. Sitzungsberichte der Marburger Gesellschaft für die Beförderung der gesammten Naturwissenschaften. Vom Juni 1899.

A. Kossel¹⁾ auf Lysin verarbeitet. Der Lösung, bis zum dicken Syrup eingedampft, wurde eine gesättigte alkoholische Lösung von Pikrinsäure hinzugefügt, solange noch die Bildung eines krystallinischen Niederschlags bemerkbar war. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Alkohol und Aether ausgewaschen und in einem Scheidetrichter durch verdünnte Salzsäure in Gegenwart von Aether zersetzt. Nachdem die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Aether völlig entfernt war, wurde die Lösung mit Thierkohle entfärbt, bis zum dicken Syrup eingedampft, mit concentrirter Salzsäure gemischt und noch weiter bis zur Krystallisation verdickt. Der abgekühlten, theilweise krystallinischen Masse wurde Alkohol und wenig Aether allmählich zugefügt, solange noch ein ganz krystallinischer Niederschlag entstand. Der Niederschlag wurde sodann abgesaugt und in der beschriebenen Weise zweimal mit Hülfe von Alkohol und Aether umkrystallisirt.

Die Elementaranalyse der in Vacuumexsiccator bis zum constanten Gewicht getrockneten Substanz gab folgende Resultate:

0,1475 g Substanz gaben	0,177 g CO ₂ und	0,1018 g H ₂ O
0,1072 „ „	0,1302 „ CO ₂ „	0,0766 „ H ₂ O
0,1163 „ „	0,1507 „ AgCl	
0,2445 „ „	0,0004 „ Asche	
0,2764 „ „	0,0005 „ „	

Gefunden:			Berechnet für:	
			$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$	
C	32,73%	33,12%	—	32,87%
H	7,67%	7,93%	—	7,31%
HCl	—	—	32,95%	33,33%
Asche	0,18%	0,16%	—	—

Die Substanz zeigte keinen scharfen Schmelzpunkt; sie fing bei 194—195° C. zu schmelzen an; bei 200—202° entstanden die Gasbläschen.

Die wässerige Lösung dieses Salzes reagirt stark sauer.

Die Resultate der Polarisationsuntersuchung dieses Salzes sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 165—189.

Anzahl der Molek. HCl auf 1 Molekül $C_6H_{11}N_2O_2 \cdot 2HCl$	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^{25}$ für	
						$C_6H_{11}N_2O_2 \cdot 2HCl$	$C_6H_{11}N_2O_2$
0	4 dm	20° C	18,430	1,0569	+ 13,00	+ 16,68	+ 25,02
0	4 "	20° "	11,067	1,0324	7,48	16,36	24,54
0	4 "	20° "	5,606	1,0167	3,66	16,05	24,07
0	4 "	20° "	2,835	1,0081	1,78	15,57	23,35
1	4 "	20° "	11,719	1,0455	8,44	17,22	25,83
2	4 "	20° "	9,762	1,0453	7,04	17,25	25,87
4	4 "	20° "	7,299	1,0454	5,19	17,00	25,50
8	4 "	20° "	4,844	1,0460	3,45	17,02	25,53

Da das Lysin bei der Darstellung aus dem Phosphorwolframat mit Baryt in Berührung bleibt, so schien es mir von einigem Interesse zu sein, die Wirkung des Baryts auf diese Base im Polarisationsapparat zu verfolgen. Diese Versuche wurden in folgender Weise angestellt. Ich bereitete mir eine Lösung von Lysincarbonat und stellte die Drehung derselben fest — Lösung I der folgenden Tabelle. Darauf wurde dieser Lösung zuerst Barytwasser zugesetzt, so lange noch ein Niederschlag von Baryumcarbonat entstand, und nachher ein gleiches Volumen einer gesättigten Lösung von Barythydrat hinzugefügt: die Flüssigkeit in einem luftdicht zugeschlossenen Kolben im kochenden Wasserbade 3 Stunden gehalten, abgekühlt, mit Kohlensäure behandelt, auf dem Wasserbade abgedampft, durch Thierkohle entfärbt und von Neuem im Polarisationsapparat untersucht — Lösung II der folgenden Tabelle.

Lösung III der Tabelle wurde in der beschriebenen Weise 22 Stunden behandelt.

Die IV. Lösung wurde untersucht, nachdem sie bei 100° mit Baryumhydrat gesättigt, 42 Stunden im kochenden Wasserbade gehalten und durch Kohlensäure von Barythydrat befreit war. Der Gehalt aller dieser Lösungen an Lysin wurde aus dem Gehalt an Stickstoff berechnet.

Bei diesen Behandlungen war eine schwache Entwicklung von alkalischen Dämpfen zu constatiren.

Die Resultate der Polarisationsuntersuchungen der genannten Lösungen sind folgende:

Lösungen	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^t$ für $C_6H_{10}N_2O_2$
I.	1 dm	20°	3,683	1,0178	+ 0,64	+ 17,09
II.	1 „	22°	2,599	1,0113	0,42	15,97
III.	4 „	22°	0,583	1,0014	0,28	11,97
IV.	4 „	22°	2,818	1,0777	1,22	10,04

Aus diesen und den vorhergehenden Versuchen sind folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Das von mir untersuchte Lysin dreht als Chlorid und als Carbonat nach rechts.

2. Die Erhöhung seines Drehungsvermögens unter der Einwirkung von Salzsäure ist bedeutend.

3. Das spezifische Drehungsvermögen dieses Lysins nimmt bei Verdünnung der Lösung, in Gegenwart von Salzsäure, nur ganz wenig ab, dass dadurch die Möglichkeit für eine genauere quantitative Bestimmung dieses Lysins als Chlorid gegeben wird.

4. Bei dem andauernden Erhitzen einer Lösung des Lysins mit Barythydrat nimmt ihr Drehungsvermögen allmählich ab. Man wird dieses bei den quantitativen Untersuchungen über diese Base berücksichtigen müssen.

Nachdem A. Kossel darauf hingewiesen hat, dass das Lysinikrat ein gut krystallisirendes, schwer lösliches Salz ist, welches sich zur Darstellung des Lysins besonders eignet,¹⁾ müssen Untersuchungen über die Löslichkeit dieses Salzes sehr erwünscht sein. Behufs Feststellung dieser Grösse habe ich das rohe Lysinikrat aus heissem Wasser dreimal umkrystallisirt, mit Alkohol und Aether ausgewaschen und im Exsiccator bis zum constanten Gewicht getrocknet.

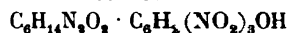
Die Analyse gab folgendes Resultat:

0,1772 g Substanz lieferten 0,248 g CO_2 und 0,0812 g H_2O .

¹⁾ l. c.

Gefunden :

Berechnet für:



C 38,23

38,40

H 5,09

4,53

Das Salz wurde in heissem Wasser gelöst, die Lösung abgekühlt, bei 21—22° C. mehrere Stunden stehen gelassen und filtrirt. 5 ccm. des Filtrats gaben 0,027 g Substanz, bei 105° getrocknet. Also zeigte sich, dass die bei 21—22° C gesättigte wässerige Lösung von Lysinmonopikrat 0,54% dieses Salzes enthielt.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. A. Kossel für die Ueberlassung der Themata und für die mir in reichem Maasse gewährte Unterstützung bei meiner Arbeit meinen herzlichsten Dank zu sagen.

Beiträge zur Kenntniss des Invertins.

Von

W. A. Osborne.

(Der Redaction zugegangen am 5. August 1899.)

Geschichtliches.

Die Entdeckung, dass Hefe im Stande ist, Rohrzucker in eine gährungsfähige Masse umzuwandeln, verdankt man dem Jenenser Chemiker Döbereiner. In seiner im Jahre 1814 gegebenen Mittheilung, ¹⁾ welche den Titel führt: « Beitrag zur chemischen Geschichte der Gährungsmittel », heisst es wörtlich: « Aus den vorstehenden Beobachtungen und Versuchen geht hervor, dass... Hefenhydrat gepulverten Zucker liquid macht und sich mit diesem zu einer honigartigen Masse verbindet, welche für sich nicht in Gährung übergeht, wohl aber, wenn sie mit Wasser verdünnt worden. »

Den ersten Versuch, den wirksamen Körper zu isoliren, hat im Jahre 1860 Berthelot²⁾ gemacht. Er versetzte ein in der Kälte bereitetes wässeriges Extract der Hefe mit Alkohol und erhielt weisse Flocken, die, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, eine braune hornartige Masse bildeten. Diese war stickstoffhaltig und wurde beim Kochen sowie durch Zusatz von Salpetersäure aus ihrer wässerigen Lösung gefällt.

Einen neuen Versuch dieser Art machte 11 Jahre später Hoppe-Seyler.³⁾ Auf der Naturforscher-Versammlung zu Rostock im Jahre 1871 zeigte dieser zum ersten Male ein aus

1) Schweigg. Journ. Bd. XII, S. 234 (1814).

2) Comptes rendus. Bd. L, S. 980 (1860).

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. IV, S. 810.

Bierhefe, die zuvor durch Behandlung mit Aether getödtet worden war, abgeschiedenes Ferment vor, das invertirend wirkte. Dasselbe stellte ein weisses, in Wasser lösliches Pulver dar, das im trocknen Zustande und unter Alkohol unverändert aufbewahrt werden konnte. Von der lebenden Hefe wird das Ferment nach Hoppe's Meinung zurückgehalten und an das Wasser nicht abgegeben. Tödtet man die Hefe indessen durch Zusatz von etwas Aether, so lässt sich das Ferment leicht durch Wasser ausziehen und kann dann aus dieser Lösung gewonnen werden. Seine wässerige Lösung bewirkt rasch die Umwandlung des Rohrzuckers. Hoppe-Seyler «wies an einer im Soleil'schen Polarisationsapparate befindlichen Rohrzuckerlösung, die er mit etwas klar filtrirter Fermentlösung versetzte, im Verlaufe von etwa einer Stunde eine starke Verminderung der Rechtsdrehung nach». Ueber die Zusammensetzung des Körpers hat Hoppe-Seyler keinerlei Angaben gemacht. Man hat daher auch keine Anhaltspunkte zur Entscheidung der Frage, ob sein Präparat bereits rein oder ob es noch mit Mineralbestandtheilen und mit Eiweisskörpern verunreinigt war.

Ein Jahr später, 1872, hat W. Gunning¹⁾ in Amsterdam Untersuchungen über Hefen zu dem Zwecke angestellt, ihnen ihr Gährungsvermögen zu entziehen. Er benutzte zur Extraction des fraglichen Ferments Glycerin. Frische Hefen wurden sehr fein in Wasser zertheilt, durch ein feines Sieb geschlagen und nachher so lange decantirt, bis das überstehende Wasser nicht mehr gefärbt war. Sie wurden dann in einem Tuche ausgepresst, in reinem Glycerin zertheilt und einige Tage an einem mässig erwärmten Orte aufbewahrt. Diese Flüssigkeit liess sich mittels einer Bunsen'schen Wasserpumpe durch eine dünne Schicht Bimstein, mit Filtrirpapier überdeckt, klar abfiltriren. Das Filtrat enthielt keine unter dem Mikroskope erkennbaren Zellen, reducirte Fehling'sche Lösung beim Erwärmen nicht, wirkte aber auf Rohrzucker schnell invertirend. Das im Filtrat enthaltene Ferment «gehört», so meinte der Referent, «wahr-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. V, S. 821.

scheinlich zu den Albuminaten; denn die Lösung coagulirt beim Erwärmen; Alkohol präcipitirt es vollständig daraus, und das Präcipitat stellt, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, ein gelbliches, in Wasser unlösliches und Rohrzucker gegenüber unwirksames Pulver dar. Es enthält viel Stickstoff und Phosphorsäure, zeigt die Schwefelreaction und weiter alle bekannten Reactionen der Eiweisskörper. »

Weiteres über die Zusammensetzung des Körpers ist in jener Mittheilung nicht enthalten. Genaue Elementaranalysen scheinen von Gunning nicht ausgeführt zu sein. Solche wären freilich auch ganz nutzlos gewesen, da ja das trockene Präparat, wie erwähnt, gar nicht mehr wirksam war.

Einen wesentlichen Schritt vorwärts hat im Jahre 1875 Ed. Donath¹⁾ gethan. Er erschöpfte die Hefe zunächst fast mit absolutem Alkohol, presste sie dann ab und trocknete sie bei gelinder Temperatur möglichst vollständig. Die dabei gebildete spröde Masse wurde hierauf fein zerrieben und bei gewöhnlicher Temperatur mit Wasser ausgelaugt. Um sie völlig von Hefezellen zu befreien, musste man die Flüssigkeit nöthigenfalls durch doppelte Filter filtriren, erhielt sie aber trotz alledem nicht klar.

Als man sie nun mit Aether schüttelte, schied sich eine froschlaichartige Masse ab, die sich in der Aetherschicht ablagerte. Die ätherhaltige Gallerte wurde mehrmals durch Schütteln mit Wasser gewaschen und endlich in absoluten Alkohol getropft, wobei sich sogleich weisse Flocken ausschieden. Dieselben wurden abfiltrirt, mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum getrocknet. War die durch Schütteln mit Aether erhaltene Gallerte rein weiss gewesen, so wurde das schliesslich durch Trocknen im Vacuum gewonnene Präparat pulverig und gleichfalls weiss, im anderen Falle aber ganz hornartig und dunkel gefärbt. Die so dargestellte Substanz war indes allem Anschein nach in Wasser unlöslich « und nur in sehr hohem Grade aufquellbar, welcher Zustand höchster Aufquellung freilich einer Lösung sehr gleich

1) Bericht d. Deutsch. Chem. Gesellsch. Bd. VIII, S. 795.

kommt». Die scheinbare Lösung liess sich dann auch nur im Anfange glatt filtriren. Allmählich nämlich wurden die Filterporen von der aufgequollenen Substanz verstopft, bis schliesslich die weitere Filtration vollständig aufhörte.

«Ein sehr geringes Quantum dieser Substanz genügt, um gelösten Rohrzucker schon bei gewöhnlicher Temperatur in 10—15 Minuten zu invertiren. Gekochte Stärke, ebenso Dextrin, wurden bei keiner Temperatur dadurch verändert. Der Körper gab wohl die Millon'sche Reaction, nicht aber diejenige von Adamkiewicz. Gegen die Vermuthung, dass er dennoch zu den Eiweissstoffen gehören könne, sprechen nach Donath die Resultate der Elementaranalyse seines reinsten Präparates.

Donath fand nämlich bei zwei Analysen (a und b):

	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff
a)	40,48	6,88	9,47 (Dumas)
b)	40,53	6,38	9,36 (Will-Varrentrapp).

Dass die Substanz bei der Verbrennung Asche hinterlassen habe, gibt Donath zwar nicht ausdrücklich an; es geht dies aber mit Sicherheit daraus hervor, dass sich Donath neben anderen Untersuchungen auch diejenige der mineralischen Bestandtheile seines Ferments vorbehält.¹⁾

Uebrigens ist es Donath, dem das fragliche Ferment den Namen Invertin verdankt; am Schlusse seiner Mittheilung schlägt ihn der Autor zum ersten Male vor.

Den nächsten Fortschritt in der Chemie des Invertins brachten die Bemühungen M. Barth's zu Stande. Barth war vor allen Dingen bestrebt, das Darstellungsverfahren zu verbessern, und verwarf deshalb sowohl die direkte Extraction der Hefe mit Glycerin, wie die unmittelbare Behandlung der frischen oder mit Alkohol erschöpften Hefe mit Wasser.

Ausgehend von der bekannten Thatsache, dass ungeformte Fermente, wie diejenigen des Pankreas oder das Emulsin, im trockenen Zustande dreist bis auf 100° erhitzt werden dürfen, ohne an Wirksamkeit einzubüssen, erhitzte er Presshefe, die

1) a. a. O. Bd. VIII, S. 797.

2) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. XI, S. 474, (1878).

zuvor bei gewöhnlicher Temperatur in einer flachen Schale so weit getrocknet worden war, dass sie sich zwischen den Fingern zu einem staubfeinen Pulver zerreiben liess, zunächst in fein gepulvertem Zustande etwa 6 Stunden lang auf 100—105°, um die Masse nach dem Erkalten partieweise mit Wasser zu einem nicht allzudünnen gleichförmigen Brei anzurühren und diesen 12 Stunden lang bei 40° stehen zu lassen.

Der wässerige Auszug wurde hierauf durch ein Colirtuch gepresst und dann erst durch ein Faltenfilter filtrirt, was immer langsam von Statten ging. Das gelbbraune, aber klare und dünnflüssige Filtrat gab endlich, in die 5—6fache Menge 95 %igen Alkohols eingegossen, einen weissen wolkigen Niederschlag, der sich beim Umrühren bald flockig zusammenballte, gut absetzte und aufs Filter bringen liess. Derselbe enthielt das Ferment noch mit Eiweisskörpern verunreinigt. Durch die Fällung mit Alkohol und durch öfteres Auswaschen mit solchem waren aber die letzteren in Wasser unlöslich geworden. Brachte man daher den ausgepressten Niederschlag von Neuem mit einer eben genügenden Menge Wasser zusammen, so löste sich nunmehr nur das Ferment, während das Eiweiss gallertartig zurückblieb. Abermaliges Eingiessen der klar filtrirten Lösung in das 5—6fache Volumen Alkohol brachte jetzt das völlig eiweissfreie Ferment zur Fällung. Man erhielt dieses schliesslich als ein schneeweisses, leicht zerreibliches Präparat, wenn der Niederschlag durch oftmaliges (mindestens 10maliges) Auswaschen mit absolutem Alkohol völlig von Wasser befreit, dann abgepresst und im Vacuum getrocknet worden war. Hatte man dagegen zum Auswaschen nicht völlig absoluten, sondern 95 %igen Alkohol verwandt, so blieb das Präparat klebrig und trocknete im Vacuum zu einer braunen hornartigen Masse ein, die schwierig zu pulvern, im Wasser nicht mehr völlig löslich und obendrein unwirksam war.

Das schneeweisse Präparat, dessen Ausbeute durchschnittlich etwa 0,4 % betrug, gab mit Wasser eine gelbbraunliche klare Lösung, der alle charakteristischen Eiweissreactionen fehlten.

Bei der Analyse des Körpers zeigte sich, dass er noch

sehr viel Asche hinterliess; doch machte man im Laufe der weiteren Untersuchung die Erfahrung, dass der Aschengehalt um so mehr sank, je öfter die Procedur des Lösens in Wasser und des Ausfällens mit Alkohol wiederholt wurde; was freilich gleichzeitig die Wirksamkeit des organischen Restes herabsetzte.

Die Elementaranalyse eines schneeweissen, sehr wirksamen, aber noch 22,01% Aschenbestandtheile enthaltenden Präparats gab folgende, für aschefreie Substanz berechnete, procentische Werthe:

	I	II	III	Mittel
C	44,2	44,6	—	44,4
H	8,5	8,3	—	8,4
N	6,4	5,5	—	6,0
S	—	—	0,63 ¹⁾	0,63
O	—	—	—	40,57

Die Wirksamkeit so gewonnenen Invertins war im Allgemeinen geringer als die anderer ungeformter Fermente: z. B. lieferten 0,005 g in 100 ccm. einer 5%igen Rohrzuckerlösung innerhalb einer halben Stunde bei 40° nicht mehr als 0,1 g Invertzucker.

Was von späteren Untersuchungen über das Invertin vorliegt, kommt für den von mir verfolgten Zweck, die Darstellung trockenen Invertins in möglichst reinem Zustande, kaum in Betracht.

Die an sich sehr wichtigen Beobachtungen über unser Ferment, die Kjeldahl mittheilte,²⁾ betreffen nur die Bedingungen seiner Wirksamkeit. Dasselbe gilt für Adolf Mayer's³⁾ Untersuchungen vom gleichen Jahr, deren Gegenstand einmal die «Tödtungstemperatur» des Invertins und sodann «die für die Wirksamkeit des Invertins günstigste Temperatur» bildeten.

Ein beiläufiger Versuch A. Sheridan Lea's,⁴⁾ das Ferment darzustellen, verdient nur deshalb Erwähnung, weil Lea

1) Die Schwefelbestimmung war an einem Präparate ausgeführt das nur 11,8% Asche hinterliess.

2) Jahresber. f. Thierchemie, Bd. XI, S. 448, (1881).

3) Ebenda, S. 449 ff.

4) Ebenda, Bd. XV, S. 206 ff., (1885).

der von Hoppe-Seyler vertretenen Meinung beipflichtet, dass den Hefezellen das betreffende Ferment erst dann entzogen werden könne, wenn sie abgestorben seien.

Die Darstellungsmethode bietet nichts Neues; das gewonnene Präparat war allerdings pulverförmig, aber nicht rein; es gab deutliche Xanthoproteinsäurereaction. Eine Elementaranalyse wurde nicht ausgeführt.

Auch Sullivan und Thompson¹⁾ machen keinen ernsthaften Versuch, das reine Ferment zu isoliren; sie behaupten dagegen, dass nur kranke Hefen Invertin liefern können.

A. Fernbach²⁾ beschränkt sich darauf, den Nachweis zu führen, dass auch Kulturen von *Aspergillus niger* an sterilisiertes Wasser ein Ferment abgeben, das Rohrzucker zu invertiren vermag.

Den letzten Versuch, das wirkliche Invertin darzustellen, hat Wroblewski³⁾ gemacht. Er zerrieb 60 g eines von Merck dargestellten Invertins mit 600 ccm. Wasser, fällte das Filtrat mit Alkohol, löste den Niederschlag abermals in Wasser und erzeugte in dieser Lösung durch Sättigung derselben mit schwefelsaurem Ammonium wiederum einen Niederschlag. Diesen löste er von Neuem und unterwarf die Lösung so lange der Dialyse, bis die Flüssigkeit keine Trübung mit Baryumchlorid mehr gab. Dann wurde das Invertin unter Zusatz gleicher Volumina von Alkohol und Aether niedergeschlagen. Das so gewonnene Invertin war frei von Kohlehydrat, gab die Millon'sche und die Biuretreaction und invertirte Rohrzucker so stark, dass ein Tropfen seiner Lösung im Laufe von drei Minuten bei 38° ca. 3 g Rohrzucker spaltete.

Wroblewski ist der Meinung, dass alle früheren Invertinpräparate, so dasjenige Donath's, Barth's etc., durch ein Kohlehydrat verunreinigt gewesen und dass deshalb bei der Elementaranalyse derselben so niedrige Zahlen für den Stickstoff gefunden worden seien. Das anhängende Kohlehydrat

1) Journ. of the chem. soc., 1890, p. 835.

2) Recherches sur la sucrase, diastase inverse du sucre de canne. Sceaux 1890.

3) Ber.d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXI, 1. Abth., S. 1134, (1898).

sei ein besonderes, das wenigstens nach den bisherigen spärlichen Beobachtungen mit irgend einem der bekannten Kohlehydrate nicht identisch zu sein scheine. Es reducire Fehling'sche Lösung erst nach dem Aufkochen mit Salzsäure, werde durch Bleiessig gefällt und mit Ammoniumsulfat ausgesalzen. Es gebe keine Jodreaction, mit Salzsäure und Phloroglucin nur eine Braunfärbung und drehe die Polarisationssebene stark nach rechts. Es dialysire schwer, aber immer noch leichter, als die Proteinstoffe. Analysen seiner wirksamen Substanz hat auch Wroblewski nicht mitgetheilt, sowenig wie solche von dem fraglichen Kohlehydrate.

Experimentelles.

Nach allen diesen Erfahrungen früherer Forscher schien es mir die nächstliegende Aufgabe zu sein, einmal planmässige Versuche zur Entscheidung folgender Fragen anzustellen:

1) ob die gefundenen Aschenbestandtheile nur zufällige Beimengsel sind, und ob man versuchen darf, diese völlig abzutrennen, ohne die charakteristische Constitution des Ferments selbst und seine Wirksamkeit zu gefährden;

2) ob die specifisch wirksame Substanz in der That ein Proteinkörper, diesem aber in der Regel noch ein besonderes Kohlehydrat als fremder Bestandtheil beigemischt ist;

3) ob nicht umgekehrt in der wirksamen Substanz ein gleichzeitig stickstoff- und kohlehydrathaltiges Molekül vorliegt, dem, wenn es Eiweissreactionen zeigt, nur Spuren von Eiweissstoffen als Verunreinigungen anhaften.

1. Verfahren zur Darstellung des Rohmaterials.

Hat man Hefe, und zwar die käufliche Presshefe,¹⁾ einen oder mehrere Tage lang bei einer Temperatur von 20 und mehr Graden mit Wasser ausgezogen, so darf man erwarten, in diesem Auszuge neben dem invertirenden Ferment noch eine Anzahl anderer organischer Substanzen, wie Eiweisskörper und ihre

¹⁾ Für diese Untersuchung habe ich Presshefe aus Grünwinckel im Schwarzwald gebraucht.

Zersetzungsprodukte, ferner etwa lösliche Kohlehydrate, vor Allem aber auch anorganische Salze anzutreffen. Fette, Lecithin und Cholesterin dagegen sollten ungelöst zurückgeblieben sein.

Was zunächst die anorganischen Salze betrifft, so hat Liebig¹⁾ die Zusammensetzung zweier Hefenaschen gegeben, die jedenfalls auf seine Veranlassung hin bereitet und analysirt worden sind. Die beiden Aschen enthielten:

	I	II
Phosphorsäure	44,76 %	48,53 %
Kali	29,07 „	30,58 „
Natron	2,46 „	—
Kalk	2,39 „	2,10 „
Magnesia	4,09 „	4,16 „
Kieselsäure	14,36 „	—
Chlor, Kohlensäure }	2,12 „	—
Eisenoxyd		

Aehnlich zusammengesetzt, nur noch reicher an phosphorsaurem Salze, war eine Hefenasche, die Belohoubek analysirte.²⁾ Der letztere fand nämlich:

Phosphorsäure	51,1 %
Schwefelsäure	0,57 „
Kieselsäure	1,6 „
Chlor	0,03 „
Kalium	38,68 „
Natrium	1,82 „
Magnesium	4,16 „
Calcium	1,99 „
Verschiedenes	0,06 „

Mitscherlich³⁾ endlich untersuchte eine Hefenasche, die sogar 59,3 % Phosphorsäure neben 28,3 % Kali und 12,5 % Magnesia enthielt.

Jedenfalls ist der Reichthum an Phosphorsäure in allen Hefenaschen höchst auffallend. Vom phosphorsauren Kali

1) Liebig's Annalen, Bd. 153, S. 1, (1869).

2) Erwähnt in Dr. Edmond Kayser, Die Hefe. Morphologie u. Physiologie. Praktische Bedeutung der Hefereinzucht. Autorisirte deutsche Ausgabe von Dr. E. P. Meinecke. München u. Leipzig, 1898, S. 17.

3) Liebig a. a. O., S. 11.

meinte Liebig,¹⁾ dasselbe sei offenbar in der Hefe in einer chemischen Verbindung, wie etwa in den Getreidesamen, enthalten, da es sich durch Auswaschen nicht entziehen lasse. Indessen wird sich aus dem Folgenden ergeben, dass auch wässerige Extracte, wenn sie nach dem sogleich zu beschreibenden Verfahren bereitet werden, sehr reich an diesem Salze sind.

Ich habe in meinen Versuchen, ein reines Ferment zu gewinnen, die Hefe in den meisten Fällen zunächst mit 96%igem Alkohol angerieben und den Brei, jedes Mal bestehend aus einem halben Kilo Presshefe und einem halben Liter Alkohol, während 16—24 Stunden im Zimmer ruhig stehen gelassen. Es geschah dies hauptsächlich, um die Eiweisskörper zu coaguliren. Alsdann habe ich den Alkohol durch Filtriren entfernt, die rückständige Masse abgesaugt, hierauf mit ungefähr 500 ccm. Chloroformwasser (5 ccm. Chloroform auf 1 Liter Wasser) angerührt und den Brei sechs Tage lang unter häufigem Umschütteln bei einer Temperatur von 30—35° erhalten. Am Ende wurde der Hefebrei auf mehrere Faltenfilter gebracht, aus denen das Filtrat sofort in grosse, je 1 Liter fassende Glascylinder abtropfte, deren jeder zu etwa $\frac{3}{4}$ mit 96%igem Alkohol gefüllt war. Die Filtration ging freilich langsam von Statten; indessen ballten sich die weissen flockigen Niederschläge, die von den einzelnen Tropfen erzeugt wurden, bald zu einem dichten Klumpen zusammen, der bequem von der Flüssigkeit getrennt und auf einem Filter wiederholt mit absolutem Alkohol gewaschen werden konnte. Nach dem Trocknen unter Schwefelsäure und im Vacuum stellte das so gewonnene Material eine grauweisse, bröckliche Masse dar, die ausserordentlich wirksam war, aber nach dem Verbrennen stets noch beträchtliche Mengen Asche hinterliess. Zwei verschiedene Präparate, die auf diese Weise erhalten worden waren, gaben:

- I. 0,6186 g trockener Substanz hinterliessen 0,2758 g Asche.
 II. 0,3032 g trockener Substanz hinterliessen 0,0959 g Asche.

I.	II.
44,58%	31,62% Asche.

¹⁾ Liebig a. a. O. S. 11.

Das klare alkoholische Filtrat, das von diesem Niederschlage abfließt, reagirt jedesmal schwach sauer. Sammelt man alle diese Filtrate von den einzelnen Darstellungen und dampft man sie ein, so behält man ein sehr werthvolles Extract übrig, aus dem sich leicht reichliche Mengen von Leucin, Tyrosin und andere stickstoffhaltige Körper gewinnen lassen. Versetzt man aber das saure Filtrat unmittelbar mit wässerigem Ammoniak, so beginnt alsbald die Bildung von grösseren glänzenden Blättchen, die der Analyse zu Folge nichts anders sind als Krystalle von Diammoniumphosphat.

Ich will dieses aschenreiche Präparat im Folgenden als Präparat A bezeichnen. Um seiner kräftigen Wirksamkeit willen habe ich mir in der Fabrik von E. Merck in Darmstadt später mehrere hundert Grammen davon darstellen lassen. Diese dienten als Rohmaterial für weitere Reinigungsversuche.

Lässt man die frische Hefe nicht vorher längere Zeit mit Alkohol in Berührung, sondern zieht man sie ohne Weiteres mit dem chloroformhaltigen Wasser aus, um sogleich weiter, wie oben, zu verfahren, so erhält man ein Präparat, das allerdings wirksam genug, dafür aber reicher an fremden Bestandtheilen ist. Es soll Präparat B heissen.

Um eine richtige Vorstellung von dem Werthe der nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Rohpräparate zu erhalten, stellte ich mir auch ein solches nach der Barth'schen Vorschrift dar — es heisse Präparat C —, wobei nur die Erhitzung der trockenen Masse etwas höher, nämlich bis zu 120°, getrieben wurde.

Und endlich combinirte ich die Methode Barth mit der, nach welcher Präparat A gewonnen war, das heisst: nachdem die Hefe zuerst mit 96%igem Alkohol behandelt, dann abgepresst, hernach aber bei gewöhnlicher Temperatur an der Luft getrocknet worden war, wurde sie mehrere Stunden hindurch einer Temperatur von 120° im Trockenschranke ausgesetzt und dann erst mit Chloroformwasser ausgezogen. Das Endprodukt sei mit D bezeichnet.

Von diesen vier verschiedenen Rohpräparaten verglich ich 1. die Ausbeute, 2. die Löslichkeit in Wasser, 3. die Wirksamkeit.

Um letztere zu prüfen, habe ich mir von jedem der

Präparate eine 1%ige Lösung hergestellt (wobei der Gehalt mit Hülfe der vorher ermittelten Löslichkeit berechnet und eingestellt wurde), sodann von jeder dieser Lösungen 2 ccm. mit 20 ccm. einer 1%igen Rohrzuckerlösung zusammengebracht und diese Gemische eine halbe Stunde lang bei einer Temperatur von 35° erhalten. Am Ende dieser Zeit wurde jede der vier Proben rasch zum Sieden erhitzt, um das Ferment unschädlich zu machen, und nun geprüft, wieviel Cubikcentimeter von jeder derselben nöthig waren, um genau 5 ccm. Fehling'scher Lösung zu reduciren.

Unter «Löslichkeit in Wasser» ist hier nicht der gewöhnliche Begriff der Löslichkeit zu verstehen; es soll dadurch vielmehr ausgedrückt werden, wieviel Procente des Trockenpräparates wieder in Lösung gehen; denn ein Theil desselben löst sich überhaupt in Wasser nicht mehr auf.

Folgende kleine Tabelle gibt nun eine Zusammenstellung der erlangten Resultate.

Art des Präparates	Ausbeute in Procenten des angewandten Hefegewichtes	Löslichkeit des Präparates	Menge des Gemisches, die zur Reduction von 5 ccm. Fehling'scher Lösung nöthig ist, in ccm.
A	0,60	circa 96 %	3,25
B	1,70	» 75 %	3,00
C	0,70	» 96 %	circa 7,00
D	0,70	» 96 %	∞ (unwirksam)

Da 1 ccm. des aus 20 ccm. Zuckerlösung und 2 ccm. Fermentlösung zusammengesetzten Gemisches Anfangs $\frac{0,2}{22} = 0,009$ g, 3,25 ccm. also 0,029 g Rohrzucker enthielten, und da ferner 5 ccm. Fehling'scher Lösung $5 \cdot 0,005 = 0,025$ g Invertzucker entsprechen, so sind von Präparat A unter den angegebenen Bedingungen $\frac{0,025}{0,029} = 86,2\%$ Rohrzucker umgewandelt worden. Für Ferment B ergibt die Rechnung 92,6%, für Ferment C nur 40%.

2. Versuche zur Darstellung eines möglichst asche-freien Präparats.

Nach den oben mitgetheilten Erfahrungen wählte ich für meine weiteren Versuche zur Isolirung des Ferments immer nur das Präparat A. Es war von vornherein besser von Ei-weisskörpern befreit und wirkte doch nahezu ebenso kräftig wie Präparat B. Wie schon bemerkt, liess ich mir grössere Mengen davon fabrikmässig anfertigen.

Ich wog mir für den einzelnen Versuch jedes Mal etwa 20 g ab, rieb diese zuerst mit lauwarmem, ausgekochtem Wasser in einer Reibschale an, füllte dann den Brei in einen Stopfencylinder und fügte von dem lauwarmen Wasser noch so viel hinzu, dass das Gesamtvolumen der Flüssigkeit etwa 500 ccm. betrug. Nach 6—8 Stunden, während welcher das Ganze bei Zimmertemperatur öfter umgeschüttelt worden war, hatte sich ein graulicher Schleim am Boden abgesetzt, und die darüber befindliche Flüssigkeit erschien deutlich braun gefärbt. Diese wurde abgegossen und filtrirt; der Schleim aber nochmals mit lauwarmem Wasser angerührt, aufs Filter gebracht und noch einige Male mit Wasser ausgewaschen.

Der schleimige Rückstand wirkte indessen immer noch invertirend, verkohlte auch, auf dem Platinbleche erhitzt, unter Entwicklung des Geruchs nach verbranntem Horn, bestand aber zum grössten Theile aus anorganischem Materiale. Er enthielt vornehmlich Phosphorsäure und Magnesium, daneben Spuren von Eisen; er wog getrocknet ungefähr 2 g und machte somit 10% des Rohpräparates aus.

Das klare bräunliche Filtrat (F 1) war von energischer Wirksamkeit, enthielt aber noch reichliche Mengen phosphorsaurer Salze. Auf Zusatz einer genügenden Menge Ammoniak trübte es sich nämlich sofort, und diese Trübung verdichtete sich bald zu einem dicken Niederschlag von Magnesiumammoniumphosphat, der nach mehrstündigem Stehen durch Filtriren entfernt werden konnte.

Aber auch das neue Filtrat (F 2) war noch immer reich an Phosphorsäure. Dieser letztere Antheil konnte jetzt nur noch an Alkali gebunden sein.

Es wurden oben zwei verschiedene Präparate des Invertins A erwähnt, deren Aschengehalt 44,58 bzw. 31,62% betrug. Die wässerigen Auszüge (F 1) dieser Präparate lieferten, nach Entfernung der Ammoniakniederschläge und nach langsamem Eindicken der Filtrate bei niedriger Temperatur, mit Alkohol Niederschläge, deren Aschengehalt bis auf 29,30 bzw. 19,96% vermindert war.

I. 0,3818 g trockener Substanz hinterliessen 0,1119 g Asche = 29,3 %

II. 0,1447 „ „ „ „ 0,0289 „ „ = 19,96%.

Zur weiteren Reinigung des Präparats, besonders zur völligen Befreiung desselben von phosphorsaurem Salz, habe ich zwei verschiedene Wege eingeschlagen: 1. den der Dialyse, 2. den der Ausfällung des Ferments mit Ammoniak und neutralem essigsäurem Blei. Ich beschreibe zunächst den letzteren, weil ich ihn bald wieder verlassen habe, um zur Dialyse zurückzukehren.

1. Ausfällung des Ferments mit neutralem Bleiacetat bei Gegenwart von Ammoniak.¹⁾

Ein Versuch, das äusserst leicht zerstörbare Ferment aus seiner Lösung mit Blei auszufällen, hat natürlich nur dann einen Sinn, wenn die Lösung bereits frei von schwefelsauren und phosphorsauren Salzen ist. Von Chloriden kann hier nicht mehr die Rede sein, da sie selbst in der Hefenasche entweder gar nicht oder nur in verschwindend kleiner Menge vorhanden sind.

Ich habe, um dieses zu erreichen, das Filtrat (F 2) zunächst auf nahezu das doppelte Volumen verdünnt und dann eine Lösung von salpetersaurem Baryum so lange hinzugefügt,

¹⁾ Barth schreibt in seiner oben angeführten Mittheilung Liebig die bestimmte Angabe zu, dass das invertirende Ferment der Hefe die Eigenschaft besitze, «mit Bleiessig als weisser Niederschlag aus der wässerigen Lösung gefällt zu werden». Liebig selbst drückt sich vorsichtiger aus. Er sagt von dem Hefenwasser (a. a. O., S. 8): «die Flüssigkeit hat eine sehr schwach saure Reaction, sie ist farb- und geschmacklos und gibt mit Bleiessig und Gerbsäure eine schwache milchige Trübung».

bis kein Niederschlag mehr erfolgte. Zwar musste man befürchten, dass ein Theil des Ferments von dem voluminösen Barytniederschlage mechanisch mit niedergerissen worden sei, allein bei der vorher besorgten starken Verdünnung der Flüssigkeit und nach dem lange wiederholten Auswaschen des Niederschlages konnte dieser Verlust kaum mehr erheblich sein.

Waren endlich Phosphorsäure und etwaige Schwefelsäure völlig beseitigt, so befanden sich jetzt von Salzen nur noch salpetersaures Alkali und Ammoniak, sowie ein geringer Ueberschuss von salpetersaurem Baryum in der Lösung. Wurde nunmehr durch Zusatz von Bleiacetat und Ammoniak zum neuen Filtrat (F3) abermals ein entschiedener Niederschlag erzeugt, so konnte dieser neben Blei nur noch organische Substanz enthalten. In der That fiel, sowie dies geschah, ein ziemlich voluminöser, schwach gelblich gefärbter Niederschlag aus, der sich gut absetzte, bequem aufs Filter bringen und auswaschen liess. Das Auswaschen wurde so lange fortgesetzt, bis in der abtropfenden Flüssigkeit keine Salpetersäure und auch kein Baryum mehr zu finden war. Alsdann wurde der Niederschlag in viel Wasser vertheilt, durch einen langen Strom von Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Schwefelblei langsam bei einer Temperatur von 35—40° zur Syrupdicke eingedampft. Zusatz eines Ueberschusses von absolutem Alkohol zu diesem Rückstande hatte die sofortige Ausscheidung gelblicher Flocken zur Folge, die sich noch, während man umrührte, zu gröberen, Anfangs klebrigen, doch bald körnig erhärtenden Massen zusammenballten. Diese konnte man pulverisiren, auf ein Filter bringen und noch wiederholt mit absolutem Alkohol auswaschen. Nachdem der anhaftende Alkohol im Vacuum unter Schwefelsäure verdunstet war, blieb ein bräunlich gefärbtes Pulver zurück, das Rohrzuckerlösung augenblicklich invertirte.

Der niedrigste Aschengehalt, den ich bei dieser Methode gefunden habe, ist folgender:

0,3716 g trockener Substanz hinterliessen 0,0169 g Asche
= 4,54 %.

Die anderen, in derselben Weise durchgeführten Dar-

stellungen lieferten zwar gleichfalls gut wirksame Präparate, indessen war deren Aschengehalt noch höher.

Ich theile hier die Resultate der Analysen mit, die ich von 4 auf diese Weise dargestellten Präparaten erhalten habe, und bemerke dabei, dass die einzelnen Proben vorher jedes Mal im Wasserstoffstrome bei der Temperatur des siedenden Toluols getrocknet worden waren.

I. 0,1592 g trockener Substanz gaben 0,0863 g H_2O und 0,2274 g CO_2 und hinterliessen 0,0130 g Asche.

II. 0,2030 g trockener Substanz gaben 0,1070 g H_2O und 0,2804 g CO_2 und hinterliessen 0,0215 g Asche.

III. 0,3716 g trockener Substanz gaben 0,5190 g CO_2 und 0,2375 g H_2O und hinterliessen 0,0169 g Asche.

IV. 0,4227 g trockener Substanz hinterliessen 0,0492 g Asche. 0,2636 g desselben Materials gaben 0,1458 H_2O und 0,3781 g CO_2 .

	I	II	III	IV
C	42,42 %	42,13 %	43,89 %	44,28 %
H	6,55 „	6,55 „	7,45 „	6,95 „
Asche	8,16 „	10,59 „	4,54 „	11,63 „

In den beiden ersten Fällen fand sich, dass die zurückbleibenden Aschenbestandtheile sich in eine glasige Masse verwandelt hatten, die noch einige sehr kleine Theilchen unverbrannter Kohle eingeschlossen enthielten. Die Wasserstoffwerthe dürfen indessen als richtig angesehen werden. In den beiden letzten Fällen wurde die Verbrennung im Sauerstoffstrome viel länger fortgesetzt. Dies hatte möglicher Weise etwas zu hohe Werthe für den Wasserstoff zur Folge, lieferte aber dafür richtigere Zahlen für den Kohlenstoffgehalt, da nunmehr die Asche farblos und frei von Kohlentheilchen war.

Die grösste Schwierigkeit bei diesem Verfahren bereitete die Trennung des Schwefelbleies vom fermenthaltigen Filtrat. Wie von Eiweiss-, Leim- und Glykogenlösungen, so wird auch von der Lösung des Ferments immer etwas Schwefelblei fein suspendirt oder gar gelöst zurückgehalten. Wollte man aber das Schwefelblei durch Zusatz einer verdünnten Säure und nachfolgendes Stehenlassen bei gelinder Wärme zur Ausscheidung zwingen, so würde man dadurch nur die Integrität und Wirksamkeit des Ferments selbst in Gefahr bringen. Vergleichende

Versuche, die ich beiläufig hierüber angestellt, haben mir gezeigt, dass schon der Zusatz geringer Säuremengen zu einer Invertinlösung die Wirksamkeit des Ferments vollständig aufhebt.

Folgende kleine Tabelle gibt hiervon eine genaue Vorstellung.

Name der Säure	Concentration der Säure	Concentration des Invertins	Temperatur	Dauer der Einwirkung	Wirksamkeit des Invertins
Salzsäure.....	$\frac{1}{24}$ normal	5,0 ‰	35°	16 Stunden	ganz zerstört
	$\frac{1}{36}$ „	„	„	„	fast ganz zerstört
	$\frac{1}{40}$ „	„	„	„	wenig geschädigt
	$\frac{1}{48}$ „	„	„	„	gar nicht geschädigt
Schwefelsäure..	$\frac{1}{20}$ „	„	„	„	ganz zerstört
	$\frac{1}{24}$ „	„	„	„	fast ganz zerstört
	$\frac{1}{36}$ „	„	„	„	kaum geschädigt
Essigsäure.....	$\frac{1}{2}$ „	25 ‰	„	„	ganz zerstört
	$\frac{1}{4}$ „	„	„	„	gar nicht geschädigt

Zur Erklärung der Tabelle sei bemerkt, dass, wenn hier von Concentration der Säure und des Invertins die Rede ist, damit ausgedrückt sein soll, dass die Mischung der beiden die genannten Aequivalente an Säure und die bezeichneten Promille-Werthe an Ferment enthielten. Die letzteren Werthe sind auf den aschenfreien Rest eines wirksamen Ferments berechnet.

Da die Anwendung von essigsaurem Blei als Fällungsmittel so grosse Schwierigkeiten machte und zunächst nicht geeignet war, ein reines Präparat zu liefern, habe ich weitere Versuche damit aufgegeben.

Durch die Empfindlichkeit des Invertins gegen Säuren sind zugleich alle diejenigen Isolirungsverfahren ausgeschlossen, an die man wegen seiner etwaigen Fällbarkeit durch Stoffe, wie Phosphorwolframsäure, Jodwismuthjodkalium etc. in saurer Lösung, etwa auch noch denken könnte.

Als bemerkenswerth möchte ich hier noch erwähnen, dass ich in zwei Versuchen auch Bleiessig als Fällungsmittel angewandt, in beiden aber völlig unwirksame Präparate erhalten habe.

2. Verfahren der Dialyse.

Es ist zwar bekannt, dass Fermente das Vermögen besitzen, durch thierische Membranen, ebenso auch durch vegetabilisches Pergament zu diffundiren; allein man durfte vielleicht annehmen, dass anorganische Salze noch geschwinder diffundiren, als der jedenfalls complicirte organische Körper, und daher die Hoffnung hegen, dass man bei Anwendung der Dialyse zwar erheblichen Verlust erleiden, dafür aber auch ein reineres Präparat erhalten werde, als nach der Bleimethode.

Es wurden zwei verschiedene Lösungen der Dialyse unterworfen: 1. Filtrat F 2, d. i. die Lösung, die wohl von dem an Magnesium gebundenen Theile der Gesamtposphorsäure durch Ammoniakzusatz befreit, in der aber noch der grösste Theil dieser Säure, an Kalium gebunden, enthalten war; 2. ein neues Filtrat, das ich als F 4 bezeichnen will. Es war aus der vorigen Lösung dadurch gewonnen, dass man aus ihr durch Hinzufügung von Magnesiamischung (Chlormagnesium, Chlorammonium und Ammoniak) auch noch diesen letzten Antheil der Phosphorsäure gefällt hatte.

Zur Herstellung der ersteren Lösung konnte ich mich eines Materials bedienen, das Herr Professor Hüfner schon vor mehreren Jahren aus einem Rohinvertin A bereitet, seitdem in reichlicher Menge in einem Exsiccator aufbewahrt und nun die Güte hatte, mir für meine Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Es war der Rückstand des langsam und bei gewöhnlicher Temperatur unter Schwefelsäure eingedickten Filtrates F 2, eine braune, harzartige, von makroskopischen Krystallen durchsetzte Masse.

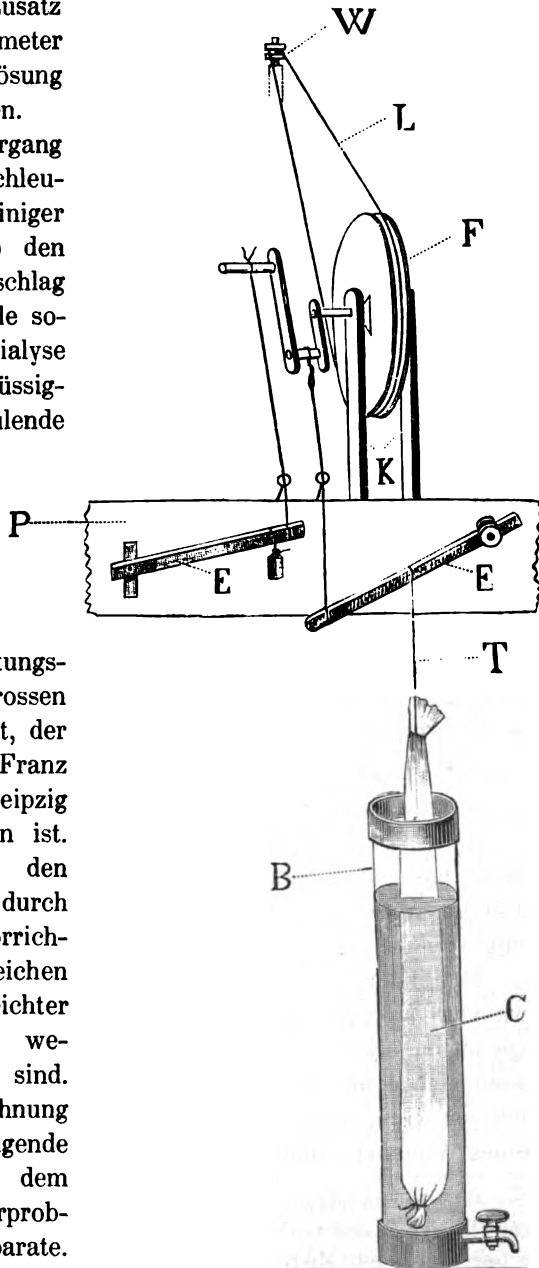
Ein kleines Bröckchen dieser Masse wirkte noch sehr kräftig invertirend und lieferte somit den Beweis, dass weder im Anfange die starke Ammoniakflüssigkeit, noch später das jahrelange Verweilen im Exsiccator die wirksame Substanz geschädigt hatte.

Die braune, nach dem Filtriren klare Lösung eines Theils dieser Substanz wurde direkt in einen langen Pergamentschlauch eingefüllt und darin mehrere Wochen lang der Dialyse gegen destillirtes Wasser unterworfen. Der Gefahr einer Zersetzung des gesuchten Ferments durch etwaige Fäulniss bei Zimmertemperatur

liess sich durch Zusatz einiger Cubikcentimeter Chloroform zur Lösung genügend begegnen.

Um den Vorgang der Dialyse zu beschleunigen, hat vor einiger Zeit Siegfried¹⁾ den praktischen Vorschlag gemacht, man solle sowohl die der Dialyse unterworfenen Flüssigkeit, wie das umspülende Medium in fortwährender Bewegung erhalten. Er hat für diesen Zweck, namentlich für die Dialyse gegen Leitungswasser, einen grossen Apparat construiert, der bei der Firma Franz Hugershoff in Leipzig käuflich zu haben ist.

Ich habe den gleichen Zweck durch verschiedene Vorrichtungen zu erreichen gesucht, die leichter herzustellen und weniger kostspielig sind. Beifolgende Zeichnung gibt eine genügende Vorstellung von dem einfachsten und erprobtesten dieser Apparate.



1) Bericht der deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXXI, S. 1825 ff. (1898).

Man sieht hier den mit der bezüglichen Lösung zu etwa $\frac{2}{3}$ gefüllten Pergamentschlauch C in dem Glascylinder B aufgehängt, der etwa eine Höhe von 60 cm. und einen Kreisdurchmesser von 10 cm. besitzt und der mit destillirtem Wasser soweit angefüllt ist, dass Niveauschwankungen um mehrere Centimeter möglich sind, ohne dass etwas von dem Wasser über den Rand des Cylinders fließt. Der ungefähr 50 cm. lange Schlauch ist an seinem unteren Ende fest mit einem Faden zusammengeschnürt und bildet so eine Art Sack mit völlig sicherem Boden. Das obere Ende des Schlauches ist mittelst eines Schnürchens T mit einem der in der Tischplatte P beweglich angebrachten Hebel E, E verbunden, die ihrerseits durch eine an der Axe der hölzernen Rolle F befestigte Kurbelvorrichtung, und zwar abermals durch Vermittelung von Schnüren, auf- und abwärts bewegt werden. Die Rolle F aber wird durch eine kleine Wasserturbine in Bewegung gesetzt.

Die Zeichen K, K stellen zwei hölzerne Träger vor, von denen die Axe der Rolle F getragen wird, während L die Triebsschnur, die zur Rolle der Turbine W führt, andeuten soll.

Durch die Auf- und Abwärtsbewegung des gefüllten Schlauches wird sowohl dessen eigener Inhalt wie die umgebende Flüssigkeit in fortwährender Bewegung erhalten und so dafür gesorgt, dass immer neue Theilchen sowohl innen wie aussen mit der Schlauchwand in Berührung kommen. Das Wasser im Glascylinder B kann entweder durch fortwährenden Zufluss aus einem Wasserständer bei entsprechendem Abfluss durch einen Heber, oder durch öftere völlige Entleerung und Neufüllung des Cylinders erneuert werden.

Hatte der Vorgang der Dialyse, wenn ohne Bewegung, etwa vier Wochen lang, wenn mit Bewegung, höchstens acht Tage angedauert, so wurde der Inhalt des Pergamentschlauches, dessen Menge in der Regel $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Liter betrug, rasch bei niedriger Temperatur (25—30°) im Vacuumapparate auf ein kleines Volumen eingedampft¹⁾ und dieser Rest mit einem

¹⁾ In meinen letzten Versuchen wurde die aus dem Schlauche entnommene Flüssigkeit erst noch durch ein Pukall'sches Thonfilter filtrirt, um die Gegenwart von Mikroorganismen ein für alle Male auszuschliessen.

Ueberschuss von absolutem Alkohol und wasserfreiem Aether versetzt. Dabei schied sich ein flockiger, schwach bräunlich gefärbter, anfangs harzartig zusammenklebender, bald aber hart und bröcklich werdender Niederschlag aus, der ohne Schwierigkeit aufs Filter gebracht und mit absolutem Alkohol gewaschen werden konnte. Nach dem Trocknen im Vacuum und unter Schwefelsäure stellte er eine lockere, sehr leichte und zu einem staubfeinen Pulver zerreibbare, grauliche Masse dar, die in der That ein sehr kräftiges Inversionsvermögen besass.

Die Verbrennung vier verschiedener, durch ruhige, d. h. nicht durch Bewegung des Schlauches beschleunigte Dialyse des noch phosphorsäurehaltigen Filtrates F2 gewonnener Präparate lieferte folgende Resultate:

I. 0,2273 g trockener Substanz gaben 0,369 g CO_2 und 0,1318 g H_2O und hinterliessen 0,0042 g Asche.

II. 0,2623 g trockener Substanz gaben 0,4165 g CO_2 und 0,1500 g H_2O und hinterliessen 0,0059 g Asche.

III. 0,1943 g trockener Substanz gaben 0,3196 g CO_2 und 0,1148 g H_2O und hinterliessen 0,0034 g Asche.

IV. 0,2455 g trockener Substanz hinterliessen 0,0202 g Asche. 0,1927 g derselben Substanz gaben 0,2869 g CO_2 und 0,1217 g H_2O .

	I. 1)	II. 1)	III. 1)	IV. 2)
C	44,86 %	45,11 %	44,30 %	45,07 %
H	6,56 „	6,69 „	6,55 „	6,46 „
Asche	1,72 „	1,85 „	2,24 „	8,22 „

Stickstoffbestimmungen wurden zunächst nicht ausgeführt, wenn gleich solcher vorhanden war. Die Kohlenstoff- und Wasserstoffprocente sind auf aschefreie Substanz berechnet. Die Asche selbst enthielt noch Phosphorsäure, Kalium und Spuren von Eisen.

Das Ergebniss der Dialyse ist hiermit auffallend günstig. Man sieht, dass sich die der wirksamen organischen Substanz ursprünglich beigemengten anorganischen Bestandtheile um so vollständiger durch Dialyse entfernen lassen, je länger die letztere dauert, und zwar ohne dass der organische Rest eine Einbusse an Wirksamkeit erleidet.

1) Vier Wochen dialysirt.

2) Zwei Wochen dialysirt.

Die Aschenbestandtheile gehören also jedenfalls nicht zur Constitution des fraglichen Körpers.

Unterwirft man das Filtrat F4, d. i. die mit Magnesia-mischung von sämmtlicher Phosphorsäure befreite Lösung der Dialyse nach der verbesserten Methode, so erhält man am Ende eine ebenso lockere und leichte, auch ebenso wirksame Masse wie im vorigen Falle.

Vier auf solche Weise hergestellte Präparate gaben folgende analytische Resultate:

- I. a) 0,1963 g trockener Substanz hinterliessen 0,0108 g Asche;
 b) 0,1416 g derselben Substanz gaben 0,2198 g CO_2 und 0,0788 H_2O ;
 c) 0,3180 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 16 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge, bei einem Barometerstand von 745 mm. und einer Temperatur von 6° .
- II. a) 0,2668 g trockener Substanz hinterliessen 0,0138 g Asche;
 b) 0,2351 g derselben Substanz gaben 0,3664 g CO_2 und 0,1268 H_2O ;
 c) 0,2418 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 12 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge bei einem Barometerstand von 725 mm. und einer Temperatur von 10° .
- III. a) 0,2226 g trockener Substanz hinterliessen 0,0151 gr. Asche;
 b) 0,4936 g derselben Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 26,59 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge bei einem Barometerstand von 737 mm. und einer Temperatur von 18° .
- IV. 0,2611 g trockener Substanz hinterliessen 0,0048 g Asche.

	I.	II.	III.	IV.
C	44,05 %	44,81 %	—	—
H	6,54 >	6,31 >	—	—
N	6,03 >	5,70 >	6,58 %	—
Asche	5,50 >	5,17 >	6,78 >	1,83 % ¹⁾

Der Aschengehalt war hier zwar wiederum ein grösserer, als in den Versuchen mit der ersten Lösung, ein Umstand, der wegen kürzerer Dauer der Dialyse sowie auch wegen des

1) Die Untersuchung der wirksamen Substanz auf einen etwaigen Schwefelgehalt gab zwar in Spuren ein positives Resultat, allein wegen Gegenwart der Asche lässt sich nicht sagen, ob der gefundene Schwefel ein integrierender Bestandtheil des organischen Materials oder ein anorganisches Beimengsel war.

Zusatzes überschüssiger Magnesiainmischung nicht zu verwundern ist; dagegen ist die Thatsache bemerkenswerth, dass die Kohlenstoff- und Wasserstoffprocente der aschefreien Substanz so gut wie gar nicht alterirt sind gegenüber den entsprechenden Procenten, die im Durchschnitte bei den vorigen Präparaten gefunden wurden. Man vergleiche die folgende Zusammenstellung der beiderseitigen Mittelwerthe.

Filtrat F 2

C 44,83%

H 6,56 »

Filtrat F 4

C 44,43%

H 6,43 »

Man hat bei festen organischen, hochmolekularen Substanzen, die nicht krystallisiren, die auch bei höherer Temperatur nicht schmelzen, die ferner entweder in gar keinem, oder nur in einem einzigen Lösungsmittel und zwar darin leicht und ohne Rückstand löslich sind, kein anderes Kriterium für die Entscheidung der Frage, ob in ihnen ein einfaches Individuum oder vielmehr ein Gemenge mehrerer solcher vorliegt, als den Grad der Uebereinstimmung im Procentgehalte an Kohlenstoff, Wasserstoff und etwaigen andern Elementen, der sich bei den Analysen der verschiedenen, d. h. nach verschiedenen Methoden dargestellten, Präparate derselben Substanz ergibt. Denn wenn das jedes Mal vorliegende Präparat nur ein Gemenge verschiedener Substanzen, in unserem Falle z. B. von Ferment, Eiweiss und Kohlehydraten ist, so lässt sich kaum verstehen, weshalb das Verhältniss der Mengen, in welchem die einzelnen Bestandtheile darin vertreten sind, bei allen verschiedenen Darstellungen genau dasselbe bleiben sollte. Vielmehr darf man um so eher das Gegentheil erwarten, nach je verschiedeneren Methoden die einzelnen Präparate und aus je verschiedenem Rohmateriale sie gewonnen wurden.¹⁾

In diesem Sinne erscheinen die beiden angeführten Resultate, da sie auf dem Wege der Dialyse aus verschiedenartig behandelten und aus ganz verschiedenem Rohmateriale dargestellten Lösungen erhalten wurden, in der That beachtens-

¹⁾ Vgl. hierzu die Bemerkungen, die sich in der Abhandlung Hüfner's: «Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen», Kolbes Journal, 5, 372, finden.

werth genug und dürfen die Hoffnung erwecken, dass die gefundene procentische Zusammensetzung der analysirten Präparate der wahren Zusammensetzung des gesuchten Körpers nicht mehr gar ferne stehen möchte.

Was nun die Reactionen meiner so durch Dialyse gereinigten Präparate anlangt, so sind auch diese nicht ohne Bedeutung. Freilich beweisen sie vielmehr, was der Körper nicht ist, als was er ist, oder, — wenn das Vorliegende doch noch ein Gemenge wäre —, welcher Bestandtheil in diesem nicht enthalten sein kann.

Vor allen Dingen wurde die wässrige Lösung auf Eiweiss geprüft. Folgende Reihe gibt eine Uebersicht über den Ausfall der angestellten Proben.

I. Fällungsreactionen.

1. Erhitzen zum Sieden mit nachherigem Zusatz von concentrirter Salpetersäure: negativ.
2. Zusatz starker Mineralsäuren bei Zimmertemperatur
 - a) Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure: negativ,
 - b) Methaphosphorsäure: negativ.
3. Zusatz von Metallsalzen
 - a) Kupfersulfat: positiv,
 - b) neutrales wie basisches Bleiacetat: positiv,
 - c) Quecksilberchlorid: negativ.
4. Ferrocyankalium in essigsaurer Lösung: negativ.
5. Erhitzen mit gesättigter Lösung von Natriumsulfat nach dem Ansäuern mit Salz- oder Essigsäure: negativ.
6. Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat bei Siedetemperatur: negativ.
7. Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung: positiv.
8. Gerbsäure in essigsaurer Lösung: negativ.
9. Pikrinsäure in essigsaurer Lösung: negativ.
10. Kaliumquecksilberjodid in salzsaurer Lösung: negativ.
11. Kaliumwismuthjodid in essigsaurer Lösung: negativ.
12. Trichloressigsäure: negativ.
13. Alkohol: positiv.

II. Färbungsreactionen.

1. Millon's Reaction: schwach positiv.
2. Xanthoproteinsäurereaction: schwach positiv.
3. Adamkiewicz'sche Reaction: negativ.
4. Biuretprobe: schwach positiv.
5. Erwärmen mit concentrirter Salzsäure: negativ.
6. Concentrirte Schwefelsäure und Zucker: negativ.

Die Gegenwart von gewöhnlichem Eiweiss ist hiermit ein für alle Male ausgeschlossen; aber auch Albumosen und Peptone, an welche letztere namentlich die ungemeine Löslichkeit des wirksamen Pulvers in Wasser, sowie die Anfangs klebrig flockige Form des durch Alkohol erzeugten Niederschlages erinnern konnte, sind nach dem Ausfall gewisser Reactionen, wie das Fehlen des Niederschlages nach Zusatz von Quecksilberchlorid, von Kaliumquecksilberjodid in saurer Lösung und von Gerbsäure, nicht vorhanden.

Könnten aber die Präparate nicht andererseits Gemenge einer stickstoffhaltigen Substanz mit einem Kohlehydrate, und sollte letzteres, da das Pulver ja so leicht in Wasser löslich ist, nicht Glykogen sein?

In der That gibt die Lösung mit α -Naphtol und concentrirter Schwefelsäure eine entschiedene Kohlehydratreaction, auch reducirt sie nach dem Erwärmen mit Salzsäure sofort Fehling'sche Lösung; dagegen wird sie von Jod, auch bei Gegenwart von Kochsalz, keineswegs gefärbt; auch konnte ich bei der Untersuchung der allerdings etwas bräunlich gefärbten Lösung mit dem Pfister'schen Polaristrobometer ein optisches Drehungsvermögen an ihr bisher nicht wahrnehmen.

Warum aber muss denn die mir vorliegende, äusserst wirksame Substanz durchaus ein Gemenge sein? Könnte sie nicht schon selbst das gesuchte Ferment, und als solches gleichzeitig stickstoff- und kohlehydrathaltig sein? Aus den oben (Seite 420 und 421) mitgetheilten Daten schon jetzt bestimmtere Schlüsse auf die wirkliche Zusammensetzung und Natur des Körpers ziehen, wohl gar darauf schon eine empi-

rische Formel gründen zu wollen, wäre allerdings unerlaubt und durchaus verfrüht; doch ist die Bemerkung gestattet, dass das Verhältniss der gefundenen Procentzahlen zu einander in der That einigermaßen an dasjenige erinnert, das nach der von Schmiedeberg¹⁾ angenommenen Formel $C_{18}H_{30}N_2O_{12}$ in der Zusammensetzung des bekannten Chitins zum Ausdruck kommt. Auch das Hyalin Lücke's,²⁾ der organische Hauptbestandtheil der Wand der Echinococcencystensäcke, scheint ähnlich zusammengesetzt zu sein.

Es enthält nämlich:

das Chitin	das durch Dialyse gereinigte Invertinpräparat	Hyalin älterer Blasen
C 46,35 %	44,69 %	45,3 %
H 6,44 »	6,51 »	6,5 »
N 6,01 »	6,10 »	5,2 »

Bekanntlich färbt sich eine Lösung von Chitin in concentrirter Salzsäure beim Erhitzen nach einiger Zeit intensiv schwarzbraun, und dampft man die Lösung nach etwa einstündigem Kochen auf dem Wasserbade ein, so scheiden sich zugleich mit dem salzsauren Glycosamin schwarze humusartige Massen aus, die wohl stark hygroskopisch, aber doch zum grössten Theile in Wasser unlöslich sind.

Kocht man nun ein wenig von dem Pulver meines gereinigten Invertins mit concentrirter Salzsäure, so bräunt sich die Lösung ebenfalls und scheiden sich allmählich auch schwärzliche Massen aus. Filtrirt man von diesen ab und erwärmt dann das Filtrat eine Stunde lang mit Eisessig und Phenylhydrazin im Wasserbade, so krystallisiren gelbe Nadeln einer Verbindung aus, die vermuthlich ein Osazon ist.

Der Schmelzpunkt dieser mit Aceton gewaschenen und aus heissem verdünnten Alkohol umkrystallisirten Substanz wurde zwar bei 196° statt bei 205° gefunden, allein eine zur Kontrolle

1) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. 28, S. 41.

2) Virchow's Archiv. Bd. 19, S. 189.

ausgeführte Stickstoffbestimmung derselben lieferte in der That Zahlen, die für ein Glykosazon sprechen können.

0,1286 g trockener Substanz gaben bei der volumetrischen Bestimmung 17,5 ccm. Stickstoff, abgeschlossen über starker Kalilauge, bei 730 mm. und einer Temperatur von 16°.

Berechnet für



15,6 %

Gefunden

15,51 %

Ich hoffe, dass sich alle diese Fragen mit grösserer Bestimmtheit werden entscheiden lassen, so bald erst reichlichere Mengen des kostbaren reineren Materials zu Gebote stehen. Für jetzt muss ich mich begnügen, einen Weg gefunden zu haben, auf dem überhaupt ein reineres und zugleich sehr wirksames Präparat gewonnen werden kann.

Vorliegende Arbeit wurde in dem physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen unter Leitung des Herrn Professor Hüfner ausgeführt, dem ich für seinen freundlichen Rath und seine gütige Unterstützung meinen wärmsten Dank ausspreche. Ganz besonders bin ich ihm verpflichtet für die Ueberlassung resp. Beschaffung eines grossen Theiles des zur Arbeit verwandten Materials.

=====

Ueber die Plasminsäure.

Von

Alberto Ascoli.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 2. August 1899.)

Diejenigen phosphorhaltigen Stoffe, welche man ursprünglich unter der Bezeichnung «Nuclein» zusammenfasste, haben sich als durchaus verschiedenartig erwiesen. Nachdem die Gruppe der «Paranucleinstoffe» abgetrennt und die Nucleine als Verbindungen von organischen phosphorhaltigen Säuren (Nucleinsäuren) mit Eiweisskörpern charakterisirt waren, ergab sich, dass die als Nucleinsäuren bezeichneten Verbindungen durchaus verschiedenartig sind. Nach A. Kossel¹⁾ können dieselben in 3 Gruppen eingetheilt werden: 1) Thymonucleinsäuren, 2) Gruppe der Inosinsäure und Guanylsäure, 3) Plasminsäure. Die Thymonucleinsäuren sind unter sich verschiedenartig. Zum Beispiel zeichnet sich eine derselben dadurch aus, dass sie gelatinirende Lösungen bildet,²⁾ während andere diese Eigenschaft nicht besitzen.

Unter dem Namen «Plasminsäure» wurde von A. Kossel³⁾ eine aus Hefe dargestellte Substanz beschrieben. Ich will die Ergebnisse seiner Untersuchungen wörtlich wiedergeben: «Die Plasminsäure unterscheidet sich von der Nucleinsäure schon

1) Liebreich's Encyclopädie, Bd. III.

2) A. Kossel, Weitere Beiträge zur Kenntniss der Nucleinsäure. Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abtheilung 1894, S. 195.

3) Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abtheilung 1893, S. 160 und folgende.

durch ihre Löslichkeitsverhältnisse. Sie löst sich auch nach längerem Aufbewahren leicht in Wasser, ebenso in sehr verdünnter, wässriger Salzsäure und kann auf diese Weise von der Nucleinsäure getrennt werden. Sie fällt Eiweiss wie die Nucleinsäure. Ihre Analyse ergab, dass sie der Formel $C_{15}H_{28}N_6P_6O_{30}$ entspricht, mithin enthält sie doppelt soviel Phosphor wie die Nucleinsäure selbst. Unterwirft man sie der Spaltung durch siedende verdünnte Säuren, so gehen aus ihr die Nucleinbasen hervor, ferner entsteht eine noch nicht näher untersuchte stickstoffhaltige organische Substanz, welche ihren Stickstoff bei weiterer Einwirkung der Säuren als Ammoniak abgibt, und drittens bildet sich Phosphorsäure.

Neben der Plasminsäure und wahrscheinlich durch weitere Zersetzung aus ihr entsteht nun noch eine zweite Säure, über welche ich später berichten werde, aus deren Untersuchung hervorgeht, dass sie weniger Sauerstoff enthalten muss, als die Phosphorsäure. Wir haben hier wahrscheinlich eine Anhydridform der Phosphorsäure vor uns, und in der That entsprechen die Eigenschaften dieser Substanz im Wesentlichen denjenigen der Metaphosphorsäuren.»

Erwähnenswerth ist, dass L. Liebermann¹⁾ schon vorher aus der Hefe das Barytsalz einer Säure dargestellt hatte, die einige Eigenschaften mit der Metaphosphorsäure gemein haben sollte. L. Liebermann glaubt auch den Beweis geliefert zu haben, dass diese Säure Metaphosphorsäure ist. Indess halten die Analysen einer Kritik nicht Stand.²⁾ Liebermann wurde bei seinen Untersuchungen von der Anschauung geleitet, dass die Nucleine nichts sind, als Verbindungen von Eiweiss mit Metaphosphorsäure, denen die metaphosphorsauren Salze des Xanthins und Guanins beigemischt sind.³⁾ Die Unmöglichkeit dieser Anschauung liegt auf der Hand und ist genügend erwiesen. Völlig unabhängig von diesen Anschauungen ist die Frage, ob eine Anhydridform der Phosphorsäure als solche

1) Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. XLVII, S. 155.

2) A. Kossel, loc. cit.

3) Centralblatt für die medic. Wissenschaften 1889, S. 210 u. 225.

oder in organischer Bindung in den Organismen vorkommt. Die Untersuchungen über die Plasminsäure, welche ich auf Veranlassung von Prof. A. Kossel von Neuem aufgenommen habe, haben in der That neue Gründe für das Vorkommen der Metaphosphorsäure in den Organismen geliefert.

Darstellung der Plasminsäure.

Ich führte die Darstellung, von einigen Modificationen abgesehen, nach demselben Verfahren aus, welches von Prof. A. Kossel bei seinen früheren Untersuchungen benutzt worden war. Dasselbe ist folgendes:

Zwölf Liter untergährige gepresste Hefe wurden in drei Liter 30%iger Natronlauge gelöst, nach etwa einer Viertelstunde die Lösung mit zwei Liter Wasser verdünnt, mit zwei Liter 48%iger Eisenchloridlösung gefällt und die Masse durch Spitzbeutel filtrirt. Das etwa vier bis fünf Liter betragende braune Filtrat wird in das gleiche Volumen einer Mischung von concentrirter Salzsäure und 85%igem Alkohol unter Umrühren hineingegossen. Die Salzsäuremenge muss eben ausreichen, um die Flüssigkeit sauer zu machen, und wird jedesmal durch Titrirung des alkalischen Filtrats ermittelt. Man lässt den Niederschlag sich absetzen, hebert die darüber stehende Flüssigkeit ab, centrifugirt den Niederschlag, wäscht und trocknet ihn mit Alkohol und Aether und bringt ihn in das Vacuum. Die Ausbeute an diesem Rohprodukt (A) beträgt 40—80 g; sein Phosphorgehalt 5—10%, im Mittel 7%. A wird mit Wasser extrahirt, darauf filtrirt; das gelbe Filtrat von Neuem mit Salzsäure und Alkohol, dem etwas Aether zugesetzt wird, gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und ins Vacuum gebracht. Die Ausbeute an diesem zweiten Produkt (B) beträgt 5—10 g, sein Phosphorgehalt 13—23%, gewöhnlich 14%. Wird B mit 0,1%iger wässriger Salzsäure extrahirt, das opalisirende Filtrat durch Alkohol und etwas Aether gefällt, der Niederschlag mit Alkohol und Aether gewaschen und getrocknet, so erhält man die Plasminsäure; der in wässriger Salzsäure ungelöst bleibende Theil, der auch ganz fehlen kann, ist Nucleinsäure. Die Ausbeute an Plasmin-

säure beträgt etwa 4—5 g aus 12 Liter Hefe, in einzelnen Fällen mehr, aber auch weniger. Ihr Phosphorgehalt ist im Mittel 20%, doch kommen Schwankungen bis 16% hinunter und 27% hinauf mitunter vor. In einzelnen Fällen habe ich A direkt mit 1%iger Salzsäure extrahirt und das Extract mit Alkohol und etwas Aether gefällt; der gewaschene und getrocknete Niederschlag stellte eine Säure von 16—18% Phosphor dar. In seltenen Fällen gelingt die Extraction von B mit 0,1%iger Salzsäure nicht, weil die Masse trübe durch das Filter läuft; in einem solchen Falle thut man gut, B wieder in Wasser zu lösen, mit Ammoniak zu neutralisiren und nun durch Alkohol und etwas Aether zu fällen; diese umgelöste Portion B ist nun wie gewöhnlich weiter zu behandeln.

Eigenschaften der Plasminsäure.

Das nach obiger Methode dargestellte Präparat von «Plasminsäure» stellt ein weisses oder graues Pulver dar, welches in Wasser sehr leicht löslich ist; Ammoniak ruft eine Gelbfärbung hervor. Eine concentrirte Lösung sieht gelblich aus und reagirt stark sauer. Sie gibt weder die Biuret- noch die Millon'sche Reaction und enthält keinen Schwefel. Bei der Zersetzung mittelst siedender Säuren gehen aus ihr die Nucleinbasen und Phosphorsäure hervor. Sie enthält circa 1% Eisen; auf diesen Eisengehalt komme ich noch zurück. Von den Reactionen der wässerigen Lösung scheinen mir folgende besonders bemerkenswerth:

- 1) Sie fällt Eiweiss und Witte's Pepton bei saurer Reaction der Flüssigkeit.
- 2) Sie gibt mit Silbernitrat einen weissen Niederschlag, der leicht in Ammoniak, nur theilweise in Salpetersäure löslich ist.
- 3) Mit Chlorbaryum gibt sie einen weissen flockigen Niederschlag, der unlöslich in Essigsäure, in Salzsäure leicht löslich ist.
- 4) Mit Eisenchlorid entsteht ein Niederschlag.
- 5) Nach Entfernung des Eisens mittels Schwefelammonium entsteht beim Kochen mit Phloroglucin und Salzsäure eine kirschrothe Färbung.

- 6) Mit Schwefelsäure destillirt, entsteht Furfurol, durch Rothfärbung mit essigsaurem Anilin nachgewiesen.
- 7) Das Verhalten zu wässriger Salzsäure ist je nach der Art der Darstellung und dem Phosphorgehalt ein verschiedenes. Ist die Extraction mit 0,1%iger Salzsäure ausgeführt worden, so entsteht meist ein Niederschlag, ist hingegen 1%ige Salzsäure benutzt worden, so bleibt die Flüssigkeit klar. Die phosphorreichen Präparate geben keinen Niederschlag mit Salzsäure, wohl aber die phosphorärmeren.

Die letzteren Reactionen machen es wahrscheinlich, dass hier noch eine Mischung vorliegt, in der vermuthlich die eigentliche Plasminsäure enthalten ist. Ich habe zunächst die Frage nach der chemischen Natur der Plasminsäure selbst bei Seite gelassen und mich mit der phosphorreichen Substanz beschäftigt. Mit dem Worte Plasminsäure will ich im Folgenden lediglich das Produkt bezeichnen, welches nach obiger Darstellung gewonnen ist.

Ist die phosphorreichere Substanz eine Metaphosphorsäure?

Zur Unterscheidung der Metaphosphorsäure von der Orthophosphorsäure sind bisher vorwiegend folgende Reactionen benutzt worden:

- 1) die Eiweissfällung,
- 2) die Bildung des weissen Silbersalzes,
- 3) die Bildung unlöslicher Verbindungen mit primären Aminbasen, während secundäre und tertiäre Basen nicht gefällt werden.¹⁾

Diesen Reactionen möchte ich noch zwei hinzufügen, die ich in der Litteratur nicht vorgefunden habe und die beide auf dem Verhalten zu Eisenoxyd beruhen.

Wird eine Metaphosphorsäurelösung (aus Phosphorsäureanhydrid oder aus käuflicher Metaphosphorsäure dargestellt) vorsichtig mit Eisenchlorid versetzt, so ent-

¹⁾ Schlömann, Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft, 1893, Jahrg. XXVI, S. 1020.

steht Anfangs kein Niederschlag, oder es löst sich der entstehende im Ueberschuss der Säure; versetzt man nun die Lösung mit Ammoniak, so entsteht auch jetzt kein Niederschlag, sondern eine gelbe Färbung, die bei grösseren Mengen von Eisen portweinroth wird; eine analoge Reaction hat Rose¹⁾ für das Eisenoxydul beschrieben. Auch die Pyrophosphorsäure gibt diese Reaction, doch nicht die Orthophosphorsäure; auch habe ich sie bisher bei keiner anderen Mineralsäure gefunden. Die zweite Reaction beruht darauf, dass die Metaphosphorsäure das Eisenoxyd dem Nachweis als Berlinerblau bis zu einem gewissen Grade entzieht. Wird nämlich Eisenchlorid, wie oben beschrieben, mit Metaphosphorsäure in Lösung zusammengebracht, so entsteht, wenn nicht zuviel Eisenchlorid zugesetzt worden ist, bei Versetzen der Lösung mit Ferrocyankalium und Salzsäure höchstens eine Andeutung einer Grünfärbung, während dieselbe Menge Eisenchlorid ohne Metaphosphorsäurezusatz eine sehr kräftige Berlinerblaureaction zeigt. Dass die Metaphosphorsäure es ist, die das Eisen maskirt, geht auch daraus hervor, dass, wenn von einer solchen Lösung, die auf Ferrocyankalium und Salzsäure nicht reagirt, eine Probe mit Salzsäure gekocht wird, wodurch die Metaphosphorsäure in Orthophosphorsäure übergeführt wird, jetzt die früher vermisste Berlinerblaureaction in frappanter Weise eintritt. Für die Rhodanreaction gilt dasselbe.

Alle diese genannten Reactionen habe ich auch bei der «Plasminsäure» eintreten gesehen. Zur Schlämmann'schen Reaction habe ich Phenylhydrazin als primäre Aminbase verwandt und sowohl mit freiem Phenylhydrazin in ätherischer als auch mit salzsaurem in wässriger Lösung einen Niederschlag erhalten; als secundäre Aminbase wurde Piperidin, als tertiäre Pyridin verwandt, keines von beiden bewirkte einen Niederschlag. Die Maskirung des Eisens habe ich, obgleich der Beweis hierfür schon dadurch gegeben war, dass das Eisen der Plasminsäure oft durch Ferrocyankalium und Salzsäure nicht nachweisbar ist, doch in schlagender Weise

¹⁾ H. Rose, Ueber die isomeren Modificationen der Phosphorsäure Pogg. 76, 1849.

vor Augen führen wollen. Von der durch Extraction der trockenen gepulverten Plasminsäure mit Natronlauge vom Eisen grösstentheils befreiten Plasminsäure stellte ich eine nicht allzu verdünnte Lösung dar; zugleich bereitete ich mir eine verdünnte Eisenchloridlösung und theilte dieselbe in zwei gleiche Theile: der eine mit obiger Lösung von Plasminsäure zusammengebracht gab mit Ferrocyankalium und Salzsäure kaum eine Grünfärbung, der zweite, unter den identischen Bedingungen, aber ohne jenen Zusatz, gab mit Ferrocyankalium und Salzsäure die deutlichste Berlinerblaureaction.

Das weisse Silbersalz, das eisenhaltig ist, habe ich quantitativ analysirt, und bei einem Gehalte von 14,9% an Phosphor (für metaphosphorsaures Silber berechnet 16,57% P) nur 1,7% Kohlenstoff und 0,7% Wasserstoff nebst minimalen Mengen Stickstoff gefunden, so dass etwa auf 7 Atome Phosphor 2 Atome Kohlenstoff kamen. Es lag hier also eine sehr phosphorreiche organische Verbindung oder eine Mischung eines organischen Körpers mit einer anorganischen Phosphorverbindung vor.

Auch das Phenylhydrazinsalz habe ich zu quantitativen Bestimmungen herangezogen, und dabei folgende Mittelwerthe gefunden: C 36,1, H 4,9, N 15, P 16. Diese Verbindung ist jedenfalls noch kein reines Phenylhydrazinmetaphosphat, denn dieses verlangt: C 38,29, H 4,78, N 14,89, P 16,48. Ich versuchte es zur weiteren Reinigung in das Silbersalz überzuführen, indem ich die alkalische Lösung des Phenylhydrazinsalzes mit Aether extrahirte und dann durch Fällung mit Silbernitrat das Silbersalz gewann, doch dieses enthielt noch Kohlenstoff, und zwar ergab sich auf 3 Atome Phosphor kaum 1 Atom Kohlenstoff. Es gelang mir sogar in diesem Silbersalz durch Zersetzung mit Schwefelammonium und Spaltung mittelst siedender Salzsäure Spuren von Nucleinbasen nachzuweisen.

Pohl¹⁾ hat auf drei neue, aus dem Salze Graham's gewonnene Metaphosphate aufmerksam gemacht; nämlich auf das

1) J. Pohl, Bemerkungen über künstlich dargestellte Eiweissnucleine, Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 292.

Guanidin-, das Strychnin- und das Chininsalz, von denen die beiden ersten krystallinisch sind, während das dritte sich als käsiger Niederschlag abscheidet. Auch die Lösung der nach obigem Verfahren dargestellten « Plasminsäure » gibt, nach Neutralisation mit Ammoniak, mit diesen Basen unlösliche Salze von genau demselben Verhalten, wie es Pohl für seine Metaphosphate angibt, und in der That ist es gelungen, auf diese Weise krystallisirte Verbindungen der in der « Plasminsäurelösung » enthaltenen phosphorreichereren Säure mit Guanidin und Strychnin darzustellen. Das Chininsalz ist, ebenso wie das aus dem Salze Grahams gewonnene, ein amorpher käsiger Niederschlag. Ich überzeugte mich durch Prüfung mit Silbernitrat, mit Magnesiamischung und durch die Eiweissfällung, dass in allen diesen Salzen die Gegenwart von Orthophosphaten ausgeschlossen war.

Das aus der Plasminsäure gewonnene Strychninsalz habe ich näher untersucht; es krystallisirt entweder in Nadeln oder in Prismen und rectangulären Tafeln; diese letzteren erscheinen bei krystallographischer Untersuchung schwach doppeltbrechend. Die Auslöschungsrichtung war parallel den Kanten. Eine genauere Untersuchung ist bei der Kleinheit der Krystalle nicht möglich. Das aus Grahams Salz, welches ich nach Tammann's¹⁾ Vorschrift darstellte, gewonnene Strychninsalz zeigt ähnliche Verhältnisse, doch liess sich bei der Kleinheit des Objects nichts Sicheres über die Identität aussagen.

Leider stiess die weitere Untersuchung des Salzes auf Schwierigkeiten, da es sich beim Umkrystallisiren anscheinend theilweise zersetzte. Aus einer « Plasminsäure », die 27% Phosphor enthielt, gewann ich nach einmaligem Umkrystallisiren ein eisenfreies Präparat, welches bei der Analyse folgende Zahlen ergab:

0,1925 g bei 134° getrocknet gaben mit Bleichromat gemischt verbrannt 0,4202 g CO₂ und 0,0968 g H₂O.

0,2222 g bei 134° getrocknet gaben mit Soda und Salpeter verascht nach der Molybdänmethode 0,0562 g Mg₃P₂O₇.

1) C. Tammann, Beiträge zur Kenntniss der Metaphosphate, Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 45, 1892.

	Gefunden:	Berechnet für Strychninmetaphosphat:
C	59,75 %	60,87 %
H	5,59 %	5,55 %
P	7,07 %	7,49 %

Ein sicherer Schluss auf die Zusammensetzung dieses Salzes kann hiernach noch nicht gezogen werden, doch wird man kaum zweifelhaft sein, dass hier ein Körper vorliegt, der zur Gruppe der Metaphosphorsäuren gehört.

Es ist bemerkenswerth, dass die der Plasminsäure eigenthümliche Phosphorverbindung nicht in gleicher Weise in den Lösungen der Nucleinsäure nachweisbar ist. Es handelt sich bei dieser Metaphosphorsäure um einen eigenartigen Atom-complex, der neben der «Hefenucleinsäure» in der Hefezelle vorhanden ist und über dessen genetische Beziehungen zur «Hefenucleinsäure» und zum «Nuclein» vorläufig noch nichts bekannt ist.

Ueber das Eisen der Plasminsäure.

Die nach obiger Methode dargestellte «Plasminsäure» enthält circa 1% Eisen. Dieses Eisen ist

1. durch Ferrocyankalium und Salzsäure gewöhnlich nicht nachweisbar; doch manchmal tritt bei Salzsäurezusatz die Reaction ein, ob deshalb, weil die Grenze des fester gebundenen Eisen überschritten ist, muss ich dahingestellt lassen. Aehnliches gilt für die Rhodanprobe.
2. Nach dem Kochen mit Salzsäure tritt die Berlinerblau-reaction immer auf. Ebenso verhält sich die Metaphosphorsäure (siehe oben).
3. Es ist als Schwefeleisen nachweisbar, doch tritt die Reaction erst bei Zusatz eines gewissen Ueberschusses an Schwefelammonium zur ammoniakalischen Lösung der Plasminsäure ein; verdünntes Schwefelammonium bleibt entweder ganz wirkungslos oder die Reaction vollzieht sich langsam und es kann eine eingetretene Grünfärbung sogar wieder allmählich verschwinden.
4. Es ist in salzsaurem Alkohol unlöslich; dies geht schon aus der Darstellungsweise hervor, bei der die Substanz

in einigen Fällen tagelang mit salzsaurem Alkohol in Berührung gestanden und das Eisen doch nicht in Lösung gegangen war.

5. Es wird durch Ammoniak nicht, durch Natronlauge nur allmählich und unvollkommen ausgefällt. Sogar durch direkte Extraction der Plasminsäure mit Natronlauge gelingt es nicht, das Eisen vollkommen zu entfernen.

Man wird durch diese Thatsachen an den Eisengehalt gewisser Nucleinstoffe und Paranucleinstoffe erinnert. Lubavin¹⁾ beobachtete zuerst, dass das aus Milchcasein dargestellte Paranuclein eisenhaltig ist. Bunge²⁾ stellte unter dem Namen Hämatogen ein eisenhaltiges Paranuclein aus dem Dotter des Hühnereies dar, Zaleski³⁾ isolirte aus der Leber einen ähnlichen Körper, den er als Hepatin bezeichnete, und Walter⁴⁾ gewann ein eisenhaltiges Paranuclein aus dem Dotter des Karpfeneies. Wildenow⁵⁾ bestätigte Lubavin's Befund; Hammarsten⁶⁾ fand das Pankreasnucleoproteid stark eisenhaltig. Auch Petit⁷⁾ isolirte aus Gerste eine hierher gehörige schwefelfreie Substanz, in der das Eisen «à l'état nucleinique» vorliegt.

Alle diese Präparate waren mit wässriger oder alkoholischer Salzsäure in Berührung gewesen. Es lag also nahe, eine festere Bindung des Eisens in diesen phosphorhaltigen Stoffen anzunehmen, und Bunge spricht die Ansicht aus, dass

1) Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft. X. S. 2237. Ref. von G. Wagner. 1877.

2) Ueber die Assimilation des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX S. 49. 1885.

3) Studien über die Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, S. 453. 1886.

4) Zur Kenntniss des Ichtulins und seiner Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 477. 1891.

5) Zur Kenntniss der peptischen Verdauungsprodukte des Caseins. Inaugural-Dissertation. Bern 1893.

6) Zur Kenntniss der Nucleoproteide. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, S. 19. 1894.

7) Sur une nucléine végétale. Comptes Rendus, vol. CXVI, p. 995, 1893. Citirt nach Macallum.

im Hämatogen eine «organische» Bindung des Eisens vorliege.

Durch meine Beobachtungen über das merkwürdige Verhältniss der Metaphosphorsäure zum Eisen veranlasst, stellte ich eine Verbindung von Metaphosphorsäure und Eisen folgendermassen dar. Ich setzte zu Metaphosphorsäure, die ich aus Phosphorsäureanhydrid dargestellt hatte, etwa so viel Eisenchlorid, als durch die überschüssige Säure in Lösung gehalten wurde. Die Lösung wurde mit Ammoniak abgestumpft und durch Alkohol nebst etwas Aether gefällt, mit Alkohol und Aether gut gewaschen, getrocknet und ins Vacuum gebracht. Man erhält so ein weisses, kaum gelbliches Pulver, das in Wasser Salzsäure und Ammoniak löslich ist; letztere Lösung sieht portweinroth aus. Das Eisen ist in der ammoniakalischen Lösung durch wenig Schwefelammonium überhaupt nicht, durch mehr Schwefelammonium mehr oder weniger schnell nachweisbar, je nach der Concentration. Die wässrige Lösung reagirt sauer, gibt mit Silbernitrat einen weissen Niederschlag, wird durch salzsauren Alkohol gefällt. Ich habe diese Substanz tagelang (in einem Versuch vier, im zweiten drei Tage) mit Bunge'scher Flüssigkeit¹⁾ unter häufigem Umschütteln extrahirt und im Filtrate mit Ammoniak und Schwefelammonium kein Eisen nachweisen können; erst wenn das ganze Filtrat eingedampft in ein paar Cubikcentimeter Wasser aufgenommen wurde, war so viel Eisen vorhanden, dass Ammoniak und Schwefelammonium einen schwarzen Niederschlag von Schwefeleisen erzeugten. Es waren also durch den salzsauren Alkohol nur Spuren von Eisen in Lösung gebracht worden, fast das ganze Eisen war im Rückstande zu finden. Aus diesen That-sachen geht deutlich hervor, dass in dieser Verbindung von Eisen und Metaphosphorsäure das Eisen in einer Form enthalten ist, die sich von der in der Plasminsäure vorliegenden kaum unterscheiden lässt und der Bindung des Eisens in den eisenhaltigen Paranucleinen sehr ähnlich ist.

1) 90 Volumentheile 96% Alkohols mit 10 Volumen 25% iger Salzsäure gemischt.

Nachdem ich nun das Vorhandensein einer zur Gruppe der Metaphosphorsäuren gehörigen Substanz in der «Plasminsäure» nachgewiesen habe, wird man sich der Vermuthung nicht verschliessen können, dass das Eisen auch hier an den in Form von Metaphosphorsäure enthaltenen Phosphor gebunden ist. Es liegt also nahe, in den eisenhaltigen Paranucleinen und Nucleinen eine direkte Bindung des Eisens an Phosphor anzunehmen, speciell in dem Hämatogen, aus welchem nach Altmann¹⁾ eine eiweissfällende Säure hervorgehen soll.

Der Vollständigkeit halber muss ich erwähnen, dass in neuerer Zeit Macallum²⁾ das Hämatoxylin als chemisches Reagens zur Unterscheidung des «anorganischen» vom «organischen», an Kohlenstoff gebundenen Eisen empfohlen hat. Marfori³⁾ hat aber mit demselben Reagens, bei Anwendung einer kleinen Modification, ganz entgegengesetzte Resultate erzielt. Das künstliche Ferratin, welches nach der Macallum'schen Reaction eine «anorganische» Eisenverbindung ist, verhält sich der Marfori'schen Modification gegenüber wie eine «organische» Eisenverbindung. Ich selbst habe mit den beiden Reactionen so widersprechende Resultate erzielt, dass ich von einer weiteren Anwendung vorläufig Abstand genommen habe.

Fasse ich nun kurz das Ergebniss meiner Untersuchungen zusammen, so ergibt sich Folgendes:

1. Aus der «Plasminsäure» lässt sich ein krystallisirendes Strychninsalz gewinnen, das sich vom hexametaphosphorsäuren Strychnin aus Grahams Salz⁴⁾ nicht unterscheiden lässt.

1) Ueber Nucleinsäuren. Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiol. Abth. 1889. S. 524.

2) A new method of distinguishing between organic and inorganic compounds of iron. Journ. of Physiol. 22. S. 92. 1897.

3) Sur une nouvelle réaction pour distinguer les composés organiques du fer d'avec les composés anorganiques spécialement par rapport à la ferratine. Arch. ital. de biologie. 30. 1898.

4) Das aus dem Salz Grahams gewonnene Strychninmetaphosphat dürfte ein Gemenge mehrerer Hexametaphosphate sein, da nach Tammann (l. c.) das Salz Grahams ein Gemenge mehrerer (mindestens zweier) Hexametaphosphate ist.

2. Sowohl die aus der «Plasminsäure» zu gewinnende Phosphorverbindung, wie auch die künstlich dargestellten Metaphosphorsäuren vermögen das Eisen in der Weise zu binden, dass es sich wie «organisches» oder «maskirtes» Eisen verhält.

Vielleicht dürften sich aus dieser bisher unberücksichtigten Bindungsweise des Eisens neue Gesichtspunkte zur Beurtheilung der von Macallum¹⁾ nachgewiesenen Localisation von Phosphor und Eisen in kernreichen Organen ergeben.

Es ist mir zum Schluss eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. A. Kossel für die Ueberlassung des Themas und für sein beständiges Interesse an meiner Arbeit meinen wärmsten Dank auszusprechen.

¹⁾ On the distribution of assimilated iron compounds, other than Haemoglobin and Haematin, in animal and vegetable cells. Quarterly Journal of microscopical science. N. S. 38. pag. 175, 1896. — Sowie: On the detection and localisation of phosphorus in animal and vegetable tissues. Proceed. Roy. Soc. Vol. 63, pag. 467. 1898.

Ueber das Chinosol, sein Verhalten im Thierkörper und über die Bildung gepaarter Glukuronsäuren.

Von

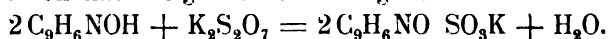
Carl Brahm, Apotheker.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 12. August 1899.)

Vor 2 Jahren erhielt Herr Prof. Thierfelder durch Herrn Regierungsrath Jacobj aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt Krystalle, die sich aus dem Harn von Thieren nach Eingabe von Chinosol spontan ausgeschieden hatten. Prof. Thierfelder betraute mich mit der näheren Untersuchung dieser Erscheinung. Die Ergebnisse sollen im Folgenden mitgetheilt werden.

Das Chinosol ist ein in letzter Zeit vielfach als Antiseptikum, Antipyretikum und Desinficiens angepriesenes Mittel, dessen Herstellung durch deutsches Reichspatent (D. R. P. 88 520) gesichert ist. Die Fabrik bezeichnet dasselbe als chinophenylschwefelsaures Kalium und auch als oxychinolinsulfosaures Kalium. Die Darstellung geschieht nach den Angaben der Patentschrift durch 10- bis 12stündiges Kochen von 2 Molekülen o-Oxychinolin in alkoholischer Lösung mit 1 Molekül Kaliumpyrosulfat am Rückflusskühler unter Umrühren. Der Process soll nach folgender Gleichung verlaufen:



Das Chinosol stellt ein krystallinisches, schwefelgelbes Pulver dar, in Wasser in jedem Verhältniss löslich. Die Lösung reagirt sauer und gibt mit Eisenchlorid eine schwarzgrüne Fällung. Durch Sodalösung trübt sie sich und erstarrt zu einem Krystallbrei von o-Oxychinolin. Auf dieses Verhalten, welches

sich mit der Auffassung des Körpers als Salz einer Sulfosäure oder Aetherschwefelsäure nicht verträgt, werde ich noch zurückkommen.

Das für meine Untersuchungen nöthige Material wurde mir von der Chinosolfabrik Franz Fritzsche & Co. in Hamburg bereitwilligst zur Verfügung gestellt.

Als Versuchsthiere dienten Hunde und Kaninchen. Einem mittelgrossen Hunde von 17,5 kg Körpergewicht gab ich Anfangs mit der Schlundsonde 10 g Chinosol in wässriger Lösung in den Magen. Da jedoch nach ungefähr 10 Minuten Erbrechen eintrat, ging ich mit der Dose auf 5 g hinunter, jedoch erbrach auch hierbei das Thier häufig genug. Die Kaninchen erhielten die Substanz ebenfalls in wässriger Lösung mit der Schlundsonde anfänglich in Dosen von 5 g. Da indessen die Fresslust abnahm und nach 7 bis spätestens 11 Tagen der Tod eintrat, verringerte ich die tägliche Dosis auf 1 g. Hierbei zeigten sich keine unangenehmen Folgen. Eines der so behandelten Thiere lebte 47 Tage, ging aber am 48. auf eine Gabe von 5 g nach 2 Stunden zu Grunde. Nicht nur der Hunde-, auch der Kaninchenharn zeigte nach Zufuhr von Chinosol stets saure Reaction. Gelegentlich schieden sich aus Kaninchenharn schon nach längerem Stehen grünlichweisse Krystalle von schön ausgebildeter Form und ansehnlicher Grösse (bis zu $\frac{1}{2}$ cm.) in grösserer oder geringerer Menge aus, und zwar wurde das stets beobachtet, wenn der Harn in Folge wasserarmer und «saurer» Nahrung (Haferschrot) von vornherein sauer und concentrirt war und das Thier eine grosse Chinosoldosis bekommen hatte. Die Erscheinung blieb dagegen aus bei wasserreicher und «alkalischer» Nahrung (Grünfutter) und bei kleiner Chinosolgabe. Im Hundeharn konnte ich die spontane Abscheidung von Krystallen nur einmal beobachten. Die Krystalle waren stark lichtbrechende Doppelpyramiden von quadratischem Habitus, ganz wie Anatas aussehend.

Die Harne drehten regelmässig die Ebene des polarisirten Lichtes nach links, stärker oder schwächer, je nach Concentration und Chinosolgabe; ferner vermochten sie bei Gegenwart von Alkali viel Kupferoxyd in Lösung zu halten. Eine Reduc-

tion zu Kupferoxydul trat beim Erwärmen nicht ein, wohl aber kam es zu einer solchen, wenn der Harn vorher mit verdünnter Salzsäure längere Zeit erhitzt worden war. Diese beiden Eigenschaften des Harns, die Ablenkung der Ebene des polarisirten Lichtes nach links und die Einwirkung auf Fehling'sche Lösung nach dem Erwärmen mit verdünnter Mineralsäure sind charakteristisch für eine Gruppe von Stoffwechselprodukten, die unter dem Namen gepaarte Glukuronsäuren zusammengefasst werden. Es lag nahe daran zu denken, dass der Harn nach Eingabe von Chinosol eine solche Verbindung enthielt.

Isolirung und Eigenschaften der linksdrehenden und nach dem Kochen mit Säure reducirenden Substanz.

Die spontan ausgeschiedenen Krystalle trennte ich durch Filtration von dem Harne und krystallisirte sie mehrfach aus heissem Wasser um. Um die in der Harnflüssigkeit noch gelöste Substanz zu isoliren, verfuhr ich zunächst nach einer Methode, welche, zuerst von Muskulus und von Mering¹⁾ zur Gewinnung der Urochloralsäure angegeben, später auch von Külz²⁾ benützt, auf der Löslichkeit mancher gepaarter Glukuronsäuren in Aetheralkohol beruht. Zu dem Zweck dampfte ich den Harn von mehreren Tagen zum dünnen Syrup ein und schüttelte wiederholt mit einer Mischung von 1 Liter Aether, 500 ccm. Alkohol, 15 ccm. Wasser und 15 ccm. concentrirter Schwefelsäure aus. Von den vereinigten ätherisch-alkoholischen Filtraten destillirte ich den Aetheralkohol ab, neutralisirte den in wenig Wasser aufgenommenen Rückstand genau mit Barytwasser, filtrirte vom schwefelsauren Baryt ab, fällte die Flüssigkeit mit Bleizucker und das vom entstandenen Niederschlag befreite Filtrat vorsichtig mit Bleiessig. Den mit heissem Wasser gut ausgewaschenen basischen Bleiniederschlag zerlegte ich mit Schwefelwasserstoff. Die vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreite Flüssigkeit gab keine Reaction auf gepaarte Glukuronsäure. Die Verbindung war also nach dieser Methode aus dem

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., 8, 662.

2) Zeitschr. f. Biol., 27, 277.

Harn nicht zu isoliren, und zwar, wie sich später zeigte, deshalb nicht, weil sie in Aetheralkohol unlöslich ist. Ich fällte nun den frischen Harn direkt mit neutralem und das Filtrat mit basischem Bleiacetat aus. Dieser letztere Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der mit Thierkohle entfärbten Flüssigkeit schieden sich nach entsprechender Concentration beim Erkalten grosse wasserhelle Krystalle aus, die sich als völlig identisch mit den spontan ausgefallenen erwiesen. Aus Kaninchen- und Hundeharn wurde ganz die gleiche Substanz erhalten.

Die Krystalle lösen sich sehr schwer in kaltem, leicht in heissem Wasser. 100 ccm. einer bei 15° gesättigten Lösung enthielten 0,12275 g, entsprechend einer Löslichkeit von 1 Thl. in 815 Thl. Wasser von 15°. Die Löslichkeit wird bedeutend erhöht durch Anwesenheit von Mineralsäuren, nicht dagegen durch Essigsäure. Die Substanz ist unlöslich in Alkohol, Aether, Chloroform u. s. w., leicht löslich in Alkali. Der Schmelzpunkt ist nicht scharf. Bei 102—105° tritt Gelbfärbung ein, bei 151° Zersetzung. Beim Erhitzen im trockenen Reagensglas bläht sich die Substanz stark auf, verkohlt und scheidet ein gelbes krystallinisches Sublimat ab. Die wässerigen Lösungen reagiren stark sauer, sie reduciren Fehling'sche Füllüssigkeit nicht direkt, sondern erst nach längerem Kochen mit verdünnter Mineralsäure. Die Untersuchung im Polarisationsapparat lässt sich wegen der Schwerlöslichkeit nicht ausführen.

Die Krystalle enthielten C, H, N und O, aber keinen S. Für die quantitativen Bestimmungen wurden sie fein zerrieben und im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtconstanz getrocknet. Hierbei verlor die lufttrockene Substanz 10,05 % Wasser (0,3738 g verloren 0,0376 g Wasser).

Die Stickstoffbestimmung führte ich nach der von M. Krüger¹⁾ angegebenen Modification (Benutzung von Kaliumbichromat) der Kjeldahl'schen Methode, welche auch bei den Chinolinderivaten völlige Gewähr für die Ueberführung des N in NH₃ bietet, aus. Sie ergab folgende Resultate:

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., 27, 609.

1. 0,12525 g Substanz verbrauchten 3,8 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Säure.
2. 0,21435 g Substanz verbrauchten 6,6 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Säure.

Gefunden:

Berechnet für $C_{15}H_{15}NO_7$:

1. 4,24 % N
2. 4,31 % N

4,36 % N.

Obgleich auf die Bestimmungen des Kohlen- und Wasserstoffs grosse Sorgfalt verwandt und mit der Methode vielfach gewechselt wurde, gelang es mir nicht, untereinander stimmende Resultate zu erhalten. Der Grund lag jedenfalls in der ausserordentlichen Schwerverbrennlichkeit des schon bei geringer Hitze an der Rohrwand sich niederschlagenden Sublimats.

In der Hoffnung, durch die Analyse der Salze besseren Aufschluss über die Zusammensetzung der Säure zu gewinnen, stellte ich zunächst das

Kalisalz

dar. Dasselbe liess sich leicht erhalten durch Umlegen der durch Kochen der wässerigen Lösung der freien Säure mit Baryumkarbonat hergestellten Barytsalzlösung mit Kaliumsulfat. Aus der vom Baryumsulfat abfiltrirten Flüssigkeit schied sich nach entsprechender Concentration die Kaliverbindung in schönen wasserhellen Pyramiden aus. Auf Alkoholzusatz entstand in der Mutterlauge noch eine weitere Krystallisation. Die Krystalle sind sehr leicht löslich in kaltem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol. Zur Analyse diente das im Vacuum über Schwefelsäure bis zum constanten Gewicht getrocknete Salz. Die Verbrennung führte ich im geschlossenen Rohr mit Bleichromat und nachträglichem Sauerstoffdurchleiten, die Stickstoffbestimmung wieder nach M. Krüger, die Kalibestimmung durch Abrauchen mit concentrirter Schwefelsäure in der Platinschaale aus.

1. 0,2012 g Substanz lieferten 0,3543 g CO_2 und 0,0896 g H_2O .
2. 0,2079 g Substanz lieferten 0,3656 g CO_2 und 0,0964 g H_2O .
3. 0,2874 g Substanz verbrauchten 7,15 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Säure.
4. 0,28935 g Substanz verbrauchten 7,35 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Säure.
5. 0,2086 g Substanz verbrauchten 5,4 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Säure.
6. 0,3726 g Substanz lieferten 0,08165 g K_2SO_4 .
7. 0,3334 g Substanz lieferten 0,0736 g K_2SO_4 .

Berechnet für

	1	2	3	4	5	6	7	Mittel	$C_{15}H_{14}NO_7K$
C	48,03	47,97	—	—	—	—	—	48,00	47,74
H	4,95	5,15	—	—	—	—	—	5,05	4,45
N	—	—	3,48	3,55	3,62	—	—	3,55	3,71
K	—	—	—	—	—	9,82	9,89	9,85	10,03

Baryumsalz.

Zur Darstellung wurde die wässrige Lösung der freien Säure mit Baryumkarbonat gekocht, filtrirt und eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen. Beim Verdunsten schieden sich schneeweisse verfilzte Nadeln des Barytsalzes aus. Dieselben sind in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich und erhalten, im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet, soviel Baryum, wie die Formel $(C_{15}H_{14}NO_7)_2 Ba + 2H_2O$ verlangt.

1. 0,1526 g Substanz lieferten 0,0442 g $BaSO_4$.

2. 0,2327 g Substanz lieferten 0,0676 g $BaSO_4$.

Gefunden:

Berechnet:

1. 17,03 % Ba

16,85 % Ba.

2. 17,06 % Ba.

Strontiumsalm.

Das in derselben Weise hergestellte Strontiumsalm verhielt sich in jeder Beziehung wie das Baryumsalm.

1. 0,2108 g Substanz lieferten 0,0518 g $SrSO_4$.

2. 0,09105 g Substanz lieferten 0,02195 g $SrSO_4$.

Gefunden:

Berechnet:

1. 11,71 % Sr

11,78 % Sr.

2. 11,49 % Sr.

Cadmiumsalm.

Die Herstellung geschah durch Umlegen des Baryumsalzes mit Cadmiumsulfat. Es krystallisirt in feinen weissen Nadeln, ist in Wasser leicht löslich und hat ebenso, wie das Baryum- und Strontiumsalm, stark elektrische Eigenschaften. Die Analyse des über Schwefelsäure im Vacuum getrockneten Salzes stimmte zu der Formel $(C_{15}H_{14}NO_7)_2 Cd$.

1. 0,2013 g Substanz lieferten 0,0392 g CdS .

2. 0,1906 g Substanz lieferten 0,0355 g CdS .

Gefunden:

Berechnet:

1. 15,14 % Cd

14,89 % Cd.

2. 14,49 % Cd.

Auch das Zink-, das Blei- und das Nickelsalm liessen sich leicht in schönen Krystallen erhalten. Sie wurden nicht analysirt.

Nach den mitgetheilten Analysen der Salze und den Stickstoffbestimmungen der freien Säure kommt dieser die

Krystallwasser, welches im Vacuum abgegeben wird, denn die lufttrocknen Krystalle verloren im Vacuum, wie oben angegeben, 10,05 % Wasser (berechnet 10,08 %).

Specifische Drehung des Kalisalzes.

Die Bestimmung geschah in einem Lippich'schen Halbschattenapparat. Das Salz war im Vacuum getrocknet. Zur Bestimmung des Nullpunktes und des Drehungswinkels wurden aus einer ganzen Reihe von Einzelbestimmungen die Mittel genommen.

Nr.	Gehalt an Substanz in 100 ccm.	Gehalt an Substanz in 100 g	Specifisches Gewicht der Lösung bei 18°	Rohr- länge in dm.	Beobachtete Winkel- drehung bei 18°	Specifische Drehung (α) _D
1	4,2285	4,1559	1,0175	2	— 7,1	83,83
2	3,7276	3,6719	1,01519	2	— 6,1	81,82
3	1,8674	1,8530	1,0078	2	— 2,86	76,59

Wie sich aus der Tabelle ergibt, nimmt die spezifische Drehung mit abnehmender Concentration der Lösung ab.

Spaltungsprodukte.

Die gefundene Zusammensetzung der Substanz stimmt sehr gut zu der Annahme, dass eine unter Austritt von Wasser zu Stande gekommene Verbindung von Oxychinolin und Glukuronsäure vorliegt. Zur Sicherstellung war die Spaltung und Identificirung der Spaltungsprodukte nothwendig. Zu dem Zwecke kochte ich 5 g der freien Säure mit etwa 100 ccm. 5 %iger Schwefelsäure mehrere Stunden am Rückflusskühler. Die Anfangs farblose Flüssigkeit färbte sich allmählich gelb bis braun. Beim Neutralisiren trübte sich das Reaktionsgemisch und erstarrte zu einem dünnen Krystallbrei. Beim Destilliren dieser trüben Flüssigkeit im Wasserdampfstrom schieden sich sowohl im Kühlrohr als in der Vorlage nadel-

förmige Krystalle ab. Beim Schütteln des Inhalts der Vorlage mit Chloroform gingen diese Krystalle in Lösung. Der beim Verdunsten des Chloroforms hinterbleibende Rückstand wurde in verdünntem Alkohol aufgenommen. Es schieden sich lange prismatische glasglänzende Nadeln ab. Krystallform, Schmelzpunkt, der bei 74° lag, und Löslichkeitsverhältnisse waren diejenigen des o-Oxychinolins. Auch die Stickstoffbestimmung stimmte.

0,1141 g Substanz verbrauchten 8,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure.

Gefunden: Berechnet für C_9H_7NO :

9,93 % N

9,65 % N.

Desgleichen zeigten die von mir hergestellten Verbindungen mit Pikrinsäure, Platinchlorid und Brom die für die entsprechenden Verbindungen des o-Oxychinolins charakteristischen Eigenschaften und die geforderte Zusammensetzung. Das Pikrat, schöne gelbe Prismen, schmolz genau bei 203° ; das Platindoppelsalz, in kaltem Wasser kaum lösliche, feine hellgelbe Nadeln, enthielt 26,34% Pt (0,1003 g Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0264 g Pt) statt der berechneten 26,4%; die Bibromverbindung, in Wasser fast unlösliche, in Benzol lösliche Nadeln, zeigte den richtigen Schmelzpunkt (bei 193°) und enthielt 52,62% Br (0,2447 g Substanz lieferten 0,3026 g Br Ag) statt der berechneten 52,8%.

Mehr Mühe erforderte die Isolirung der Glukuronsäure. Da es von vornherein schwierig, ja unmöglich erscheinen musste, sie von noch ungespaltener Substanz abzutrennen, prüfte ich in einem Vorversuch, wie lange Zeit nöthig war, um die Spaltung zu vollenden. Ich kochte 4 g Substanz mit 5%iger Schwefelsäure 10 Stunden am Rückflusskühler. Nach dieser Zeit war der Process noch nicht beendet, denn entfernte ich aus der alkalisch gemachten Flüssigkeit das Oxychinolin durch Ausschütteln mit Chloroform, stellte durch Zusatz von Schwefelsäure den ursprünglichen Säuregrad wieder her und kochte weiter, so liess sich nach einer weiteren Stunde abermals freigewordenes Oxychinolin isoliren. Erst nach zwölfstündigem Kochen war die Spaltung eine vollständige. Nach dem Ergebniss dieses Vorversuchs kochte ich 5 g der Substanz 12 Stunden mit 5%iger Schwefelsäure am Rückflusskühler.

Nach der Filtration von ausgeschiedenen Huminsubstanzen wurde mit Barytwasser ganz schwach alkalisch gemacht, mit Chloroform ausgeschüttelt und nun vorsichtig mit Schwefelsäure der überschüssige Baryt ausgefällt. Die vom Baryumsulfat filtrirte Flüssigkeit, welche nichts weiter als Glukuronsäure enthalten konnte, wurde eingedampft, zeigte aber keine Neigung, zu krystallisiren. Ich löste deshalb den Syrup in Wasser, fügte verdünnte Kalilauge bis zur schwach sauren Reaction hinzu und engte wieder ein. Jetzt schieden sich nach einiger Zeit farblose Krystalle ab, welche die Eigenschaften und die Zusammensetzung des glukuronsauren Kali hatten. Die wässerige Lösung reducirte Fehling'sche Flüssigkeit und zeigte Rechtsdrehung.

1. 0,1610 g Substanz lieferten 0,1828 g CO_2 und 0,0581 g H_2O .

2. 0,1019 g Substanz lieferten 0,0379 g K_2SO_4 .

Gefunden:	berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_7\text{K}$
30,96 % C	31,03 % C
4,01 % H	3,87 % H
16,66 % K	16,81 % K.

Somit ist die nach Eingabe von Chinosol im Harn von Hunden und Kaninchen auftretende Substanz als o-Oxychinolinglukuronsäure charakterisirt. Noch eine andere Veränderung tritt im Harn nach Chinosolzufuhr auf. Diese betrifft die Schwefelsäure, deren Menge in erheblichem Maasse vermehrt ist und zwar gilt das sowohl für die sogenannte freie als auch für die gepaarte Schwefelsäure, wie durch eine Reihe von Versuchen von mir festgestellt wurde.¹⁾ Es kann nicht zweifelhaft sein, dass die Zunahme der letzteren durch die Ausscheidung von Oxychinolinschwefelsäure bedingt ist.

Chinosol.

Das Auftreten von Oxychinolinglukuronsäure im Harn zwingt zu der Annahme, dass im Organismus aus dem Chinosol Oxychinolin frei geworden ist. Wie schon oben erwähnt, bezeichnet die Fabrik das Chinosol sowohl als oxychinolinsulfo-

¹⁾ Ausgedehnte Versuchsreihen nach dieser Richtung sind inzwischen von E. Rost (Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 15, 288) veröffentlicht worden.

saures, als auch als chinophenylschwefelsaures Kalium. Ueber das Verhalten der aromatischen Sulfosäuren im thierischen Körper liegen nur wenig Beobachtungen vor. So weit mir bekannt sind nur m- und p-phenolsulfosaures Natrium und benzolsulfosaures Natrium in dieser Beziehung geprüft worden und zwar von Salkowski¹⁾ und von Rabuteau.²⁾ Beide geben übereinstimmend an, dass diese Salze unverändert im Harn erscheinen. Dasselbe gilt von den aetherschwefelsauren Salzen der aromatischen und auch der Fettreihe, wenigstens fand Salkowski dem Hunde eingegebenes aethylschwefelsaures Natrium quantitativ im Harne wieder. Unter diesen Verhältnissen musste es sehr überraschen, dass das Chinosol nicht ebenfalls unverändert den Organismus durchläuft. Diese auffallende Erscheinung sollte bald ihre Erklärung finden. Eine nähere Prüfung des Chinosols ergab nämlich, dass es durchaus keine Aetherschwefelsäure oder Sulfosäure ist, vielmehr ein einfaches Gemenge von o. Oxychinolinsulfat mit Kaliumsulfat darstellt.³⁾ Folgende Beobachtungen lassen keinen Zweifel darüber. 1. Während Sulfosäuren und Aetherschwefelsäuren gegen Alkali sehr widerstandsfähige Verbindungen sind, gelingt es, aus einer wässerigen Chinosollösung schon nach Zusatz eines schwachen Alkali (Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat) mittelst Chloroform Oxychinolin abzutrennen. 2. Sulfosäuren und Aetherschwefelsäuren werden durch Chlorbaryum nicht gefällt, in einer wässerigen Chinosollösung dagegen entsteht auf Zusatz von Chlorbaryum ein reichlicher Niederschlag von Baryumsulfat, welcher, wie ein quantitativer Versuch zeigte, die gesammte in dem Chinosol enthaltene Schwefelmenge enthält. 0,1392 g Chinosol lieferten 0,1182 g BaSO₄, entsprechend 12,4% S, während die von der Fabrik angegebene Chinosolformel 12,2% S verlangt. 3. Wäscht man Chinosol auf einem Filter mit heissem oder mit einer grösseren Menge kalten absoluten Alkohols, so hinterbleibt ein weisses Krystall-

1) Pflüger's Arch. 4, 91.

2) Gaz. médic. 1881, 115 referiert in Maly's Jahresb. 1881, 195.

3) Zu demselben Resultat ist auch Sonntag gekommen, siehe bei Rost a. a. O. S. 299.

mehl, das aus Kaliumsulfat besteht. Aus dem alkoholischen Filtrat scheidet sich beim Verdunsten Oxychinolinsulfat in schönen Nadeln aus. 4. Lässt man eine concentrirte Chinosol-lösung auf dem Uhrglas verdunsten, so erkennt man unter dem Mikroskop sofort Kaliumsulfatkrystalle.

In dem Chinosol ist also Oxychinolin als schwefelsaures Salz in den Organismus eingeführt und dieses vereinigt sich nach Analogie anderer Stoffe zum Theil mit Glukuronsäure, zum Theil mit Schwefelsäure und erscheint in Form dieser beiden gepaarten Verbindungen im Harn. Wie nicht anders zu erwarten, gelang es, dieselbe Oxychinolinglukuronsäure aus dem Harn von Hunden und Kaninchen, die das aus dem Chinosol isolirte o. Oxychinolin*) erhalten hatten, zu gewinnen.

Ueber die Bildung gepaarter Glukuronsäuren im Körper.

Im Anschluss an das Mitgetheilte sei es mir gestattet, kurz über einen Versuch zu berichten, den ich anstellte, um Aufschluss über den Bildungsmodus der gepaarten Glukuronsäuren zu erhalten. Er fiel zwar negativ aus, dürfte aber doch von einigem Interesse sein.

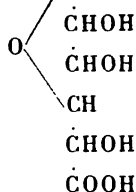
Die Glukuronsäure ist ein Oxydationsprodukt des Traubenzuckers, wie durch ihre Verwandlung in Zuckersäure¹⁾ und durch die Untersuchungen von E. Fischer und Piloty,²⁾ welche sie aus Zuckerlaktonsäure durch Reduction mit Natriumamalgam erhielten, bewiesen ist. Da die gepaarten Glukuronsäuren im Allgemeinen Fehling'sche Lösung nicht reduciren, so muss die Aldehydgruppe der Glukuronsäure festgelegt sein und es liegt am nächsten, für diese Verbindungen eine den Glukosiden entsprechende Constitution anzunehmen.³⁾ Der o-Oxychinolinglukuronsäure würde also folgende Structurformel zukommen:

*) Ueber das Verhalten der isomeren Oxychinoline im Organismus sind Untersuchungen im hiesigen Laboratorium im Gange.

1) Thierfelder, Diese Zeitschr., XI, 401.

2) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 24, 522.

3) Ebenda 26, 2403 u. 2405.



Ueber die Bildung der gepaarten Glukuronsäuren im Thierkörper ist noch nichts Sicheres bekannt. Schmiedeberg und Meyer,¹⁾ welche in der Camphoglukuronsäure die erste Verbindung dieser Art kennen lehrten und die Glukuronsäure zum ersten Mal darstellten, sprechen die Vermuthung aus, dass die Glukuronsäure ein normales Oxydationsprodukt des Traubenzuckers sei, welches für gewöhnlich sofort weiter zerfällt; in dem Fall aber, dass bestimmte Stoffe in den Organismus eingeführt werden, sich mit diesen verbindet und dadurch vor weiterer Verbrennung geschützt wird. Gegen diese Vorstellung wenden sich Fischer und Piloty,²⁾ indem sie darauf hinweisen, wie unwahrscheinlich es sei, dass bei der Oxydation des Traubenzuckers die Aldehydgruppe zunächst unverändert bleibe, während die endständige Alkoholgruppe in Carboxyl übergehe. Sie sind der Ansicht, dass beim Durchgang der die Bildung gepaarter Glukuronsäuren veranlassenden Substanzen durch den Thierkörper zunächst eine Verbindung derselben oder ihrer Umwandlungsprodukte mit Traubenzucker entsteht, in welcher die Aldehydgruppe des letzteren festgelegt und vor weiterem Angriff geschützt ist, und dass dieses Zwischenprodukt durch Oxydation in die gepaarte Glukuronsäure übergeht. Dieselbe Anschauung über die Entstehung dieser gepaarten Verbindungen ist schon früher von Sundvik³⁾ ausgesprochen worden. Eine Stütze für diese Hypothese konnte vielleicht das Verhalten der Glukoside im Thierkörper liefern. Erfahren

1) Diese Zeitschr.. III, 422.

2) a. a. O, S. 524.

3) Akademische Abhandlung. Helsingfors 1886, referirt in Maly's Jahresbericht, 1886, 76 u. in den Ber. der deutsch. chem. Gesellsch., 19. Referatbd. 762.

diese eine Oxydation der endständigen Alkoholgruppe zu Carboxyl und werden sie als die entsprechenden gepaarten Glukuronsäuren ausgeschieden, so spricht das entschieden zu Gunsten der Auffassung der oben genannten Forscher, während ein anderes Verhalten allerdings nicht im entgegengesetzten Sinn verwandt werden kann. Die vorliegenden Untersuchungen¹⁾ über das Schicksal natürlicher Glukoside im Organismus geben auf unsere Frage keine bestimmte Antwort. Ich benutzte für meine Versuche das von E. Fischer²⁾ vor einigen Jahren synthetisch hergestellte α -Methylglukosid. Als Versuchsthiere dienten Kaninchen und Hunde. Der nach Eingabe der Substanz in den Magen gelassene Harn drehte die Polarisationssebene nach rechts und reducirte nach dem Kochen mit Säuren Fehling'sche Lösung, ein Beweis, dass eine völlige Zerstörung des Glukosids nicht stattgefunden hatte, dass das Glukosid selbst oder ein ihm nahestehendes Derivat ausgeschieden war. Alle Versuche, eine gepaarte Glukuronsäure (Methylalkoholglukuronsäure) aus dem Harn zu isoliren, schlugen fehl. Um völlige Gewissheit über ihre An- oder Abwesenheit zu erhalten, versetzte ich den Harn (60 ccm.) eines Kaninchens, welches 2 g Glukosid bekommen hatte, mit soviel Salzsäure, dass er 5% HCl enthielt, erhitzte im kochenden Wasserbad 3 Stunden, entfernte die Salzsäure, machte mit Essigsäure schwach sauer und fügte Hefe hinzu. Es trat lebhafte Gährung ein, nach deren Aufhören die Flüssigkeit Fehling'sche Lösung nur noch in der schwachen, für normalen Kaninchenharn typischen Weise reducirte. Damit ist der Beweis geliefert, dass der Harn keine Methylalkoholglukuronsäure enthielt; denn würde sie vorhanden gewesen sein, so hätte nach der Spaltung und Vergährung Fehling'sche Lösung eine starke Reduction erfahren müssen.

Dieser Versuch schien mir der Mittheilung werth, wenn auch für die Entscheidung der Frage, deretwegen er angestellt wurde, nichts gewonnen worden ist.

¹⁾ Vgl. besonders Grisson, Ueber das Verhalten der Glukoside im Thierkörper. Dissert., Rostock 1887.

²⁾ Ber. der deutsch. chem. Gesellsch., 26, 2400.

Der Kochsalzgehalt des Knorpels und das biogenetische Grundgesetz.

Von
G. v. Bunge.

(Der Redaction zugegangen am 12. August 1899.)

In meiner letzten Mittheilung¹⁾ habe ich gezeigt, dass der Knorpel der Selachier zwar nicht so kochsalzreich ist, wie Petersen und Soxhlet angaben, aber doch kochsalzreicher als irgend ein anderes bisher analysirtes thierisches Gewebe. Dass in dem Organismus von Meeresbewohnern so kochsalzreiche Gewebe sich entwickelt haben, kann nicht auffallen. Beachtenswerth ist es dagegen, dass auch im Organismus der landbewohnenden Wirbelthiere der Knorpel das natronreichste Gewebe ist. Das Blut der landbewohnenden Säugethiere enthält 2,4—3,7^{0,00} Natron. Der Knorpel der Säugethiere ist weit natronreicher. Alle übrigen bisher analysirten Gewebe sind weit natronärmer als das Blut. Warum ist gerade der Knorpel das natronreichste Gewebe? Er ist insofern das älteste Gewebe, als kein anderes Gewebe der höheren Wirbelthiere so unverändert den histiologischen Bau der niederen Wirbelthiere bewahrt hat wie der Knorpel. Das Skelet der höchstentwickelten Wirbelthiere wird noch heutzutage ursprünglich als knorpeliges Skelet angelegt und erst nachträglich durch ein knöchernes verdrängt. Die ältesten Wirbelthiere aber waren sämmtlich Meeresbewohner.

1. Seite 299 dieses Bandes.

In meinem Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie¹⁾ habe ich bereits eingehender darauf hingewiesen, dass der auffallend hohe Kochsalzgehalt der landbewohnenden Wirbelthiere eine Erklärung nur findet in der Descendenzlehre. Wenn diese Auffassung richtig ist, so müssen wir nach dem biogenetischen Grundgesetze erwarten, dass die landbewohnenden Wirbelthiere um so kochsalzreicher sind, je jünger sie sind, und dass auch die Zusammensetzung des Knorpels von Thieren verschiedenen Alters diesem Gesetze folgt. Beides trifft zu. In einer früheren Mittheilung²⁾ habe ich bereits an ein paar Beispielen gezeigt, dass der Säugethierembryo natronreicher ist als das neugeborene Thier, und dieses natronreicher als ein älteres. Ich beabsichtige die Richtigkeit dieses Ergebnisses durch weitere Analysen zu prüfen. Hier will ich zunächst nur das Resultat einer Reihe von Chlor- und Natronbestimmungen am Knorpel von Säugethieren verschiedenen Alters mittheilen. Ich wählte dazu die Rippenknorpel des Rindes, weil man von diesen aus verschiedenen Altersstufen ein genügendes Quantum zur Analyse erhält. Auf der folgenden Tabelle stelle ich die Ergebnisse derselben zusammen mit den früher mitgetheilten Werthen³⁾ für den Chlor- und Natrongehalt des Knorpels der Selachier.

Auf 100 Theile des frischen Knorpels kommen:

	Trockensubstanz	Chlor	Natron
Selachier	7,22	0,483	0,659
Rinderembryo, 1 1/2 kg schwer .	13,58	0,198	
» 5 1/2 » » .	14,21	0,201	
» 30 1/2 » » .	17,51	0,202	0,595
Kalb, 14 Tage alt	21,69	0,164	0,704
» 10 Wochen »	24,76	0,170	0,645

Das erwartete biogenetische Grundgesetz tritt also beim

1) Bunge, Lehrb. d. physiol. u. pathol. Chem., Aufl. 1, S. 118—120, 1887, Aufl. 4, S. 112—114, 1898.

2) Zeitschrift für Biologie, Bd. XI, S. 324. 1874.

3) Seite 300 dieses Bandes.

Vergleiche des frischen Knorpelgewebes aus verschiedenen Entwicklungsstadien nicht zu Tage. Der Chlor- und Natrongehalt ändert sich nur wenig. Wohl aber tritt das Gesetz in Bezug auf den Gehalt an Trockensubstanz deutlich hervor. Der Gehalt des Knorpelgewebes an Trockensubstanz ist bei dem jüngsten Embryo am niedrigsten und dem des Selachierknorpels am ähnlichsten und wächst stetig mit der Entwicklung. Dass aber das biogenetische Grundgesetz auch für den Chlor- und Natrongehalt volle Geltung hat, zeigt sich sofort, wenn man den Gehalt der trockenen Knorpel vergleicht. Dieses scheint mir richtiger, denn das Chlor und das Natrium sind an die organischen Bestandtheile des Knorpels gebunden und werden mit diesen zugleich assimiliert. Das Verhältniss aber von Chlor und Natrium zu den organischen Stoffen ändert sich stetig zu Ungunsten des Chlors und des Natriums in dem Maasse, als die Entwicklung fortschreitet. Deshalb vergleiche ich auf der folgenden Tabelle den Chlor- und den Natrongehalt des trockenen Knorpels.

Auf 100 Theile der bei 120° C. getrockneten Knorpel kommen:

	Chlor	Natron
Selachier	6,692	9,126
Rinderembryo, 1½ kg schwer	1,457	
„ 5½ kg schwer	1,415	
„ 30½ kg schwer ..	1,151	3,398
Kalb, 14 Tage alt	0,757	3,245
Kalb, 10 Wochen alt	0,686	2,604

Das biogenetische Grundgesetz tritt also bei diesem Vergleiche deutlich zu Tage. Im besten Einklange mit den Analysen des Rippenknorpels vom Rinde stehen die folgenden zwei Analysen vom Knorpel aus der Nasenscheidewand des Schweins.

Auf 100 Theile des frischen Knorpels kommen:

	Trockensubstanz	Chlor	Natron
Knorpel von 4 Tage alten Ferkeln	12,08		0,557
Knorpel von ausgewachsenen Schweinen	22,11	0,051	0,830

Auf 100 Theile des bei 120° C. getrockneter Knorpels kommen:

	Chlor	Natron
Knorpel von 4 Tage alten Ferkeln.....		4,613
Knorpel von ausgewachsenen Schweinen	0,230	3,757

Beachtenswerth ist der sehr niedrige Chlorgehalt des Knorpels der ausgewachsenen Schweine. Beim Rinde konnte ich den Vergleich mit dem ausgewachsenen Thiere nicht anstellen, weil der Rippenknorpel zu früh zu verknöchern beginnt. Schon beim 10 Wochen alten Kalbe musste ich die Theile des Rippenknorpels aussuchen, welche noch gar nicht mit Knochengewebe durchsetzt waren. Das Knorpelgewebe verschiedener Skelettheile von verschiedenem Alter zu vergleichen, ist wahrscheinlich nicht zulässig. Besondere Analysen werden darüber entscheiden müssen.

Vom Knorpel aus der Nasenscheidewand des Schweines habe ich eine vollständige Aschenanalyse ausgeführt und stelle sie in der folgenden Tabelle mit der in meiner letzten Mittheilung veröffentlichten Analyse des Selachierknorpels zusammen, um zu zeigen, wie gross der Unterschied in der chemischen Zusammensetzung des Knorpels verschiedener Wirbelthiere trotz der Uebereinstimmung im histiologischen Bau werden kann.

Auf 100 Theile des frischen Knorpelgewebes kommen:

	Selachier Schultergürtel von Scymnus borealis	Säugethier Nasenscheidewand des Schweines
Wasser	92,779	77,895
Trockensubstanz . . .	7,221	22,105
Organische Substanz .	5,916	20,931
Anorganische Substanz	1,305	1,174
K ₂ O	0,1540	0,1048
Na ₂ O	0,6590	0,8304
CaO	0,0243	0,1347
MgO	0,0123	0,0203
Se ₂ O ₃	0,0002	Spur
Cl	0,4832	0,0508
P ₂ O ₅	0,0814	0,0447
Summe der anorganischen Stoffe	1,4144	1,1857
Sauerstoffäquivalent des Chlors	0,1090	0,0115
	1,3054	1,1742

Auf 100 Theile des bei 120° C. getrockneten Knorpelgewebes kommen:

	Selachier Schultergürtel von <i>Scymnus borealis</i>	Säugethier Nasenscheidewand des Schweines
Organische Substanz .	81,922	94,689
Anorganische Substanz	18,078	5,311
K ₂ O	2,132	0,474
Na ₂ O	9,126	3,756
CaO	0,337	0,609
MgO	0,170	0,092
Se ₂ O ₃	0,003	Spur
Cl	6,692	0,230
P ₂ O ₅	1,128	0,202
Summe der anorganischen Stoffe	19,587	5,363
Sauerstoffäquivalent des Chlors	1,510	0,052
	18,077	5,311

Auf 100 Theile der Asche kommen:

	Selachier	Säugethier
K ₂ O	11,795	8,924
Na ₂ O	50,481	70,721
CaO	1,864	11,471
MgO	0,940	1,729
Se ₂ O ₃	0,015	Spur
Cl	37,017	4,326
P ₂ O ₅	6,239	3,807
	108,35	100,98
Sauerstoffäquivalent des Chlors	8,35	0,98
	100,00	100,00

Ich habe bei diesen Analysen zunächst nur die Aschenbestandtheile bestimmt, weil wir nur für diese genaue Methoden der quantitativen Analyse besitzen. Es ist jedoch kaum zu bezweifeln, dass auch die Zusammensetzung der organischen Bestandtheile im Laufe der phylogenetischen und der ontogenetischen Entwicklung ebenso stetig sich ändert. Eine genaue vergleichende Analyse wird uns in den Stand setzen, den Grad der Verwandtschaft der Wirbelthiere zu beurtheilen und die Ergebnisse der vergleichenden Anatomie zu kontrolliren. Die Entwicklungsgeschichte und die Systematik der Zukunft werden keine rein morphologischen Disciplinen

bleiben. Ein endloses Feld der fruchtbringendsten Arbeit liegt hier noch völlig unbeackert vor uns.

Zahlenbelege.

1. Rinderembryo, 1575 g schwer. 4,4718 g des frischen Rippenknorpels, sorgfältig von anhaftenden anderen Geweben befreit, gaben bei 120° C. getrocknet 0,6073 g Trockenrückstand = 13,5806% Trockensubstanz und 0,0358 g AgCl = 0,1979% Cl der frischen Substanz und 1,4574% Cl der Trockensubstanz.

2. Rinderembryo, 5400 g schwer. 10,5311 g des frischen Rippenknorpels gaben 1,4960 g Trockenrückstand = 14,205% und 0,0856 g AgCl = 0,2010% Cl der frischen Substanz und 1,4146% Cl der Trockensubstanz.

3. Rinderembryo, 30 $\frac{1}{2}$ kg schwer. 1,7073 g des frischen Rippenknorpels gaben 0,2990 g Trockenrückstand = 17,5130%. 26,6570 g des frischen Knorpels gaben 0,2174 g AgCl = 0,2016% Cl des frischen und 1,1513% des trockenen Knorpels. 27,1240 g des frischen Knorpels gaben 0,3855 g KCl + NaCl, daraus 0,2658 g KPtCl₆, daraus berechnet auf 100 Theile des frischen Knorpels 0,1889 K₂O und 0,5950 Na₂O, auf 100 Theile des trockenen Knorpels 1,0784 K₂O und 3,3977 Na₂O.

4. Kalb, 14 Tage alt. 4,1612 g des frischen Rippenknorpels gaben 0,9024 g Trockenrückstand = 21,686% Trockensubstanz. 3,5187 g des trockenen Knorpels gaben 0,1077 g AgCl = 0,7568% Cl des trockenen und 0,1641 % des frischen Knorpels. 6,1298 g des trockenen Knorpels gaben 0,4658 g KCl + NaCl, daraus 0,2973 g KPtCl₆, daraus berechnet auf 100 Theile des frischen Knorpels 0,2027 g K₂O und 0,7036 g Na₂O, auf 100 Theile des trockenen Knorpels 0,9347 g K₂O und 3,2447 g Na₂O.

5. Kalb, 10 Wochen alt, 145 kg schwer. 2,2318 g des frischen Rippenknorpels gaben 0,5525 g Trockenrückstand = 24,756% Trockensubstanz. 38,451 g des frischen Knorpels gaben 0,2640 g AgCl = 0,1698% Cl des frischen und 0,6857% g Cl des trockenen Knorpels. 36,662 g des frischen Knorpels gaben 0,6265 KCl + NaCl, daraus 0,5927 g KPtCl₆, daraus berechnet auf 100 Theile des frischen Knorpels 0,3116% K₂O und 0,6446% Na₂O, und auf 100 Theile des trockenen Knorpels 1,2585% K₂O und 2,604% Na₂O.

6. 4 Ferkel, 4 Tage alt. Es wurden aus der Nasenscheidewand der 4 Thiere zusammen 2,444 g vollkommen reines Knorpelgewebe erhalten. Diese hinterliessen 0,2952 g Trockenrückstand (= 12,08%) und gaben 0,0352 g KCl + NaCl, daraus 0,0312 g KPtCl₆, daraus berechnet auf 100 Theile des frischen Knorpels 0,2460 K₂O und 0,5571 Na₂O und auf 100 Theile des trockenen Knorpels 2,037 K₂O und 4,613 Na₂O.

7. Knorpel aus der Nasenscheidewand einer grösseren Zahl von ausgewachsenen Schniween. Es wurden die rein weissen, von Blut und Knochengewebe vollkommen freien Stücke herausgeschnitten und zum

Theil frisch, zum Theil nach vorhergegangenen Trocknen bei 120° C. zur Analyse benutzt.

5,3150 g des frischen Knorpels gaben 1,1749 g Trockenrückstand = 22,105 %.

64,90 g des frischen Knorpels gaben 1,1241 g $\text{KCl} + \text{NaCl}$, daraus 0,3529 g KPtCl_6 , daraus berechnet auf 100 Theile der frischen Substanz 0,1048 g K_2O und 0,8304 g Na_2O , und auf 100 Theile des trockenen Knorpels 0,4740 g K_2O und 3,757 g Na_2O .

55,45 g des frischen Knorpels gaben 0,1140 g AgCl = 0,0508 % Cl des frischen und 0,2299 % Cl des trockenen Knorpels.

35,3240 g des trockenen Knorpels gaben eine Spur Eisen, 0,2152 g CaO und 0,0898 + 0,0218 g Mg_3PO_4 ; daraus berechnet auf 100 Theile des frischen Knorpels 0,1347 CaO , 0,0203 MgO und 0,0447 P_2O_5 , und auf 100 Theile des trockenen Knorpels 0,6092 CaO , 0,0916 MgO und 0,2021 P_2O_5 .

Nachweis von Histidin und Lysin unter den Spaltungsprodukten der aus Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

(Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 28. August 1899.)

Durch N. Rongger und E. Schulze¹⁾ ist nachgewiesen worden, dass die aus Fichten- und Weisstannensamen nach Ritthausen's Verfahren dargestellten Proteinsubstanzen beim Kochen mit Salzsäure sehr grosse Quantitäten von Basen liefern und dass unter den letzteren sehr viel Arginin sich findet. Ob neben dem Arginin auch Histidin und Lysin sich vorfanden, war unentschieden geblieben. Das grosse Interesse, das sich an die bei der Spaltung der Eiweisskörper entstehenden organischen Basen knüpft, veranlasste uns, diese Frage einer Prüfung zu unterwerfen. Mit Hülfe der von A. Kossel²⁾ angegebenen Methoden gelang es uns leicht, aus den Spaltungsprodukten der aus Fichtensamen dargestellten Proteinsubstanz Histidin und Lysin zu isoliren.

Zur Gewinnung des Histidins versetzten wir die mit Kohlensäure gesättigte wässrige Lösung der aus dem Phosphor-

1) Eine ausführliche Mittheilung N. Rongger's über die von ihm bei Untersuchung der Fichtensamen und der daraus dargestellten Protein-substanz erhaltenen Resultate findet sich in den Landwirthschaftlichen Versuchsstationen, Bd. 51, S. 81 ff. Eine ganz kurze Mittheilung über die Ergebnisse, die N. Rongger, z. Th. unter Mitwirkung von E. Schulze, bei der Spaltung der aus Fichten- und Weisstannensamen dargestellten Proteinstoffe erhielt, ist von E. Schulze in dieser Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276 und Bd. XXV, S. 360 gemacht worden.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 179 und XXVI, S. 586.

wolframsäureniederschlag abgeschiedenen Basen mit Quecksilberchlorid bis zur schwachsauren Reaction. Der durch dieses Reagens erzeugte Niederschlag wurde abfiltrirt und ausgewaschen, sodann in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber lieferte, nachdem es im Wasserbade stark eingengt worden war, bald schöne, glänzende Krystalle, welche aus Wasser umkrystallisirt wurden. Nach einer von Herrn Professor U. Grubenmann auf unsere Bitte ausgeführten krystallographischen Untersuchung entsprachen die Formen dieser Krystalle den Angaben, die von M. Bauer¹⁾ über die Krystallform des Monochlorhydrats des Histidins gemacht worden sind. Dass das Monochlorhydrat der genannten Base vorlag, wurde auch durch eine Chlorbestimmung bewiesen:

0,3335 g Substanz (über Schwefelsäure getrocknet) gaben 0,2260 g AgCl.

Berechnet für	Gefunden
$C_6H_7N_3O_2, HCl + H_2O$	
Cl 16,90 %	16,76 %

Als dem Filtrat vom Chlorsilber noch Silbernitrat und sodann tropfenweise Ammoniakflüssigkeit zugesetzt wurde, schied sich ein weisser, amorpher Niederschlag aus, welcher abfiltrirt, ausgewaschen und hierauf bei 100° getrocknet wurde. Der Silbergehalt dieses Produktes entsprach der von Hedin²⁾ für die Silberverbindung des Histidins aufgestellten Formel $Ag_2C_6H_7N_3O_2 + H_2O$, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist.

a) 0,2510 g Substanz gaben 0,1400 g Ag;	
b) 0,2800 „ „ „ 0,1560 „ „	
Berechnet	Gefunden
Ag 55,77 %	a) 55,77 % b) 55,71 %.

Aus diesen Thatsachen ist mit Sicherheit zu schliessen, dass Histidin vorlag.

Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag stellten wir Arginin dar, und zwar theils nach der von A. Kossel gegebenen Vorschrift (Ausfällen des Arginins mit Silberlösung und Barytwasser), theils nach der Methode von

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 182.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 194.

Hedin (Ueberführung des Arginins in die schwerlösliche basische Silberverbindung $C_6H_{14}N_4O_2$, $AgNO_3$). Wendet man das letztere Verfahren auf die Basenlösung an, ohne aus dieser zuvor das Histidin zu entfernen, so findet sich, wie schon von Hedin angegeben worden ist, Histidin in dem Niederschlag vor, welcher in der Basenlösung durch Silbernitrat hervorgerufen wird. Auch aus diesem Niederschlag haben wir Histidin darstellen können, indem wir denselben durch Schwefelwasserstoff zerlegten, das Filtrat vom Schwefelsilber mit Phosphorwolframsäure versetzten und den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag in bekannter Weise verarbeiteten.¹⁾

Zur Darstellung des Lysins verwandten wir das Filtrat von dem argininhaltigen Niederschlag, welcher durch Silbernitrat und Barytwasser in der Basenlösung hervorgerufen worden war. Dieses Filtrat wurde vom Silber befreit, hierauf mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch hervorgerufene Niederschlag in bekannter Weise durch Barythydrat zerlegt, die dabei erhaltene Basenlösung vom Baryt befreit, stark eingeeengt und sodann mit einer alkoholischen Pikrinsäurelösung bis zur neutralen Reaction versetzt. Bald schieden sich feine Krystallnadeln in beträchtlicher Menge aus, welche abfiltrirt und hierauf mehrmals aus heissem Wasser umkrystallisirt wurden. Der Stickstoffgehalt des in dieser Weise erhaltenen Pikrats überstieg den von der Formel $C_6H_{14}N_2O_2$, $C_6H_3N_3O_7$ geforderten Werth, was wohl auf eine Beimengung von Argininpikrat²⁾ zurückzuführen ist. Wir verwandelten daher jenes

¹⁾ Ein auf diesem Wege erhaltenes Chlorhydrat hat der eine von uns (E. Schulze) schon vor einigen Jahren Herrn Dr. S. G. Hedin übersendet, der sich für die Darstellung von Histidin aus dem Coniferenprotein interessirte. Nach einer gefälligen brieflichen Mittheilung Hedin's hatte dieses Chlorhydrat ungefähr die Zusammensetzung eines Histidindichlorids. Ein solches Salz, welches jedoch nur schwierig von einer, der Formel genau entsprechenden Zusammensetzung zu erhalten ist, wurde inzwischen auch von F. Kutscher (diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 199) dargestellt.

²⁾ Da nach W. Gulewitsch (diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 209) das Argininsilber nicht ganz unlöslich in Wasser ist, so muss in dem lysinhaltigen Filtrat vom Argininsilberniederschlag etwas

Produkt unter Hinzunahme der aus der Mutterlauge noch gewonnenen Krystalle durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether nach der von A. Kossel gegebenen Vorschrift in das Chlorhydrat. Die wässrige Lösung dieses Chlorhydrats wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt, wobei eine sehr kleine Quantität anorganischer Substanz ungelöst blieb. Die Lösung wurde wieder eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in wenig Wasser gelöst, die Flüssigkeit mit einer concentrirten Platinchloridlösung versetzt. Als dann absoluter Alkohol zugefügt wurde, schied sich binnen 12 Stunden ein Chloroplatinat in schönen gelbrothen Prismen aus — eine Erscheinung, die in Uebereinstimmung mit den von E. Drechsel¹⁾ gemachten Angaben steht. Nach Siegfried²⁾ schliesst das so dargestellte Lysinplatinchlorid Krystallalkohol ein. Zur Entfernung des letzteren trockneten wir das Salz, welches beim Liegen über Schwefelsäure verwitterte, zuerst bei 100, dann noch bei 130°. Sein Gehalt an Stickstoff, sowie auch an Platin entsprach nun der Formel $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 HCl, PtCl_4$, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:³⁾

Arginin sich finden; die Quantität des letzteren wird insbesondere dann nicht ganz unbeträchtlich sein, wenn man das Arginin durch Silbernitrat oder Silbersulfat und Barytwasser aus stark verdünnter Lösung ausgefällt und den Niederschlag anhaltend mit Wasser ausgewaschen hat. Letzteres ist also bei Ausführung der zur Trennung des Arginins vom Lysin dienenden Operationen zu vermeiden. Wir haben dies stets gethan; bei Ausführung des oben beschriebenen Versuchs lag aber eine Angabe über die Löslichkeit des Argininsilbers noch nicht vor. Es ist noch darauf aufmerksam zu machen, dass mehr Argininsilber in Lösung bleiben wird, wenn die bezügliche Flüssigkeit nicht frei von Ammoniak ist.

1) Archiv für Anatomie und Physiologie, 1891, physiologische Abtheilung, S. 259.

2) Ebendasselbst, S. 272.

3) Wie aus den oben gemachten Angaben hervorgeht, gelang die Gewinnung von reinem Lysinplatinchlorid, obgleich das als Ausgangsmaterial dienende Pikrat wahrscheinlich durch Argininpikrat verunreinigt war; dass die Anwesenheit von Arginin in solchem Falle nicht schädlich wirkt, ist auch aus folgendem Versuch zu schliessen: Wir vermischten

1) 0,2402 g Substanz gaben 11,5 ccm. reines Stickstoffgas bei 23° und 728 mm. Quecksilberdruck.

2) 0,2695 g Substanz gaben 0,0950 g Pt.

	Berechnet	Gefunden
N	5,05 %	5,17 %
Pt	35,05 %	35,25 %

Aus den im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnissen geht hervor, dass unter den Spaltungsprodukten, welche die aus Fichtensamen dargestellte Proteinsubstanz beim Erhitzen mit Salzsäure liefert, neben Arginin auch Histidin und Lysin sich finden. Das Gleiche gilt nach einer von O. Meyer in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchung¹⁾ auch für die Spaltungsprodukte der aus dem Samen der Seekiefer (*Pinus maritima*) dargestellten Proteinsubstanz.

Was die Ausbeute an den genannten Basen betrifft, so erhielten wir aus einem Proteinsubstanzpräparat, welches jedenfalls etwas mehr als 300 g Trockensubstanz enthält, ungefähr 3 g Histidinchlorid, 19 g Argininnitrat und 3 g noch unreines Lysinpikrat. Bei der Spaltung der Proteinsubstanz war also Arginin in viel grösserer Menge entstanden, als die beiden anderen Basen. Dieses Resultat steht im Einklang mit den von N. Rongger (*loc. cit.*) gemachten Beobachtungen. Die Ausbeute an Arginin, obwohl immer noch recht hoch, war aber ohne Zweifel beträchtlich niedriger als diejenige, welche Rongger bei Zersetzung des von ihm aus Fichtensamen dargestellten Proteinpräparates erhielt. Die Ursache für diese Differenz muss wohl in erster Linie in einer ungleichartigen Beschaffenheit der von Rongger und von uns verwendeten Proteinsubstanzpräparate, für deren Darstellung zwei verschiedene Muster von Fichtensamen gedient hatten, gesucht werden.

eine Lösung von Argininchlorid mit der zur Bildung des Chloroplatinats erforderlichen Platinchloridmenge, engten die Flüssigkeit stark ein und fügten dann viel absoluten Alkohol zu. Dabei entstand bei mehrtägigem Stehen keine Ausscheidung von Krystallen eines Chloroplatinats.

1) Die Ergebnisse dieser Untersuchung, in welcher es sich nicht allein um die Identificirung der aus der bezüglichen Proteinsubstanz entstehenden Spaltungsprodukte, sondern auch um die Erreichung anderer Ziele handelte, sollen später an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Man kann kaum daran zweifeln, dass man aus den Fichtensamen nach dem Verfahren Ritthausen's ein Gemenge von Proteinstoffen erhält; es ist aber sehr wohl möglich, dass dieses Gemenge nicht die gleiche Zusammensetzung besitzt, wenn zu seiner Darstellung Fichtensamen verschiedener Herkunft gedient haben. Von Einfluss auf die Beschaffenheit der Präparate kann aber auch die specielle Art und Weise sein, in der man die Extraction der Samen ausführt. Wenn man nämlich, wie dies sowohl von Rongger als von uns geschah, die zerkleinerten Samen behufs Extraction der Proteinstoffe wiederholt mit sehr verdünnter Alkalilauge behandelt, so ist es möglich, ja sogar wahrscheinlich, dass die ersten Extracte bei der Ausfällung durch Säure andere Proteinstoffe liefern, als die später dargestellten Auszüge: die durch Vereinigung der verschiedenen Fällungen erhaltenen Präparate können also eine ungleiche Beschaffenheit haben, je nachdem man die Behandlung der Samen mit Alkalilauge öfter oder weniger oft wiederholt hat. Uebrigens ist darauf aufmerksam zu machen, dass es sich in diesen Fällen nicht um genaue Ermittlung der bei Zersetzung der Proteinsubstanzen entstandenen Argininquantität, sondern nur um Bestimmung der Ausbeute an Arginnitrat handelt. Wer aber solche Darstellungen, bei denen man nur durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden Operationen zum Ziele gelangt, schon öfter ausgeführt hat, der weiss auch, dass auf die Ausbeute an dem bezüglichen Produkt zufällige Umstände zuweilen einen nicht unbeträchtlichen Einfluss ausüben. Schliesslich ist noch daran zu erinnern, dass Rongger nicht nur die Ausbeute an Arginin, sondern auch die Stickstoffmenge bestimmt hat, welche im Phosphorwolframsäureniederschlag in Form von organischen Basen sich vorfand.

Ueber das Vorkommen von Histidin und Lysin in Keimpflanzen.

Von
E. Schulze.

(Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 28. August 1899.)

Seitdem man weiss, dass aus den Eiweisskörpern bei der Zersetzung durch Säuren oder durch Trypsin neben Amidosäuren und Arginin Histidin und Lysin entstehen, musste sich die Frage aufdrängen, ob auch beim Eiweisszerfall in den Keimpflanzen neben Arginin jene beiden Basen sich bilden. Es lag freilich im Bereich der Möglichkeit, dass diese Stoffe zwar bei jenem Process in den Keimpflanzen entstehen, aber im pflanzlichen Stoffwechsel bald umgewandelt werden und in Folge davon sich niemals anhäufen; doch durfte man hoffen, dass auch in diesem Falle ihre Abscheidung und ihr Nachweis mit Hülfe der trefflichen Methoden, die für diesen Zweck von A. Kossel angegeben worden sind, vielleicht gelingen werde.

Wie von mir nachgewiesen worden ist, findet sich das Arginin in grosser Quantität in den Cotyledonen 2—3 wöchentlicher etiolirter Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Es schien angezeigt, solche Cotyledonen auch auf Histidin und Lysin zu untersuchen. Ich führte dies in folgender Weise aus: Die fein zerriebenen, lufttrockenen Cotyledonen wurden zunächst mit kochendem, 95%igem Weingeist behandelt. Der weingeistige Auszug¹⁾ wurde beseitigt, der im Weingeist unlösliche

1) Dieser Auszug enthält u. A. Cholin; auch ist es möglich, dass darin Lupinenalkaloide sich vorfinden.

Den filtrirten wässerigen Auszug versetzte ich mit einer wässerigen Lösung von Phosphorwolframsäure, nachdem er zuvor von den durch Gerbsäure und durch Bleiessig fällbaren Stoffen befreit und hierauf mit Schwefelsäure angesäuert worden war. Der sehr starke Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abfiltrirt, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, zwischen Fliesspapier stark abgepresst und sodann durch Barythydrat in der Kälte zerlegt. In die von den unlöslichen Baryumverbindungen abfiltrirte Lösung leitete ich Kohlensäure ein, um das überschüssige Baryumhydrat zu beseitigen. Nachdem dieses Ziel erreicht worden war, wurde die filtrirte Flüssigkeit noch mit Kohlensäure gesättigt und sodann mit einer wässerigen Quecksilberchloridlösung in kleinen Antheilen versetzt, bis ihre Reaction fast neutral geworden war.¹⁾ Es schied sich ein weisser Niederschlag aus, welcher nach 24 Stunden abfiltrirt,²⁾ ausgewaschen, sodann in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber lieferte, nachdem es im Wasserbade stark eingeeengt worden war, bald Krystalle. Die von denselben abgegossene Mutterlauge gab bei weiterem Verdunsten noch mehr von solchen Krystallen, doch schied sich in kleiner Menge auch noch eine andere Substanz in sehr kleinen Krystallen aus. Diese Substanz liess sich jedoch durch Abschleimmen mittelst der Mutterlauge ziemlich vollständig von den zuerst gewonnenen Krystallen trennen. Letztere wurden aus Wasser umkrystallisirt.

¹⁾ In einem Versuche, in welchem die Cotyledonen 14tägiger Keimpflanzen verarbeitet wurden, habe ich die durch Quecksilberchlorid fällbare Substanz fractionirt gefällt und die beiden Fractionen des Niederschlags getrennt verarbeitet; in einem anderen Versuche, in welchem Cotyledonen 3wöchentlicher Keimpflanzen zur Verarbeitung gelangten, geschah dies nicht. Ob in der einen oder in der anderen Weise verfahren wurde, war nicht von wesentlichem Einfluss auf das Resultat. In beiden Fällen aber habe ich nur so viel Quecksilberchlorid zugesetzt, dass in den Filtraten noch etwas von der durch dieses Reagens fällbaren Substanz sich vorfand.

²⁾ Vor der Filtration wurde die Flüssigkeit noch einmal mit Kohlensäure gesättigt.

Die Krystalle besaßen nach einer auf meine Bitte von Herrn Professor U. Grubenmann ausgeführten krystallographischen Untersuchung die für Histidinchlorid charakteristischen Formen, und zwar waren die Flächen o, p und d ausgebildet wie an dem zweiten der von Bauer¹⁾ untersuchten Histidinchloridkrystalle.

Eine Chlorbestimmung gab ein der Formel des Histidinchlorids = $C_6H_9N_3O_2, HCl + H_2O$ entsprechendes Resultat:

0.2810 g Substanz (über Schwefelsäure getrocknet) gaben	0,1885 g AgCl.
Berechnet:	Gefunden:
Cl 16,90 %	16.59 %.

Das in bekannter Weise²⁾ aus dem Chlorhydrat dargestellte Histidinsilber gab, nachdem es bei 100° getrocknet worden war, bei der Analyse folgende Resultate:

1. 0.2915 g Substanz gaben 0,1630 g Ag
2. 0.2490 „ „ „ 0,1375 „ „
3. 0.5110 „ „ „ nach Kjeldahl's Methode 0,05408 g N.

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_7N_3O_2Ag_2 + H_2O$ ³⁾	1. 2. 3.
Ag 55,77 %	55,92 % 55.22 % —
N 10,88 %	— — 10,58 %.

Diese Versuchsergebnisse beweisen, dass die aus dem Quecksilberchloridniederschlag abgeschiedene Base Histidin war.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag enthielt sehr viel Arginin. Zur Gewinnung dieser Base wurde jenes Filtrat zunächst durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber, sodann durch Zusatz der berechneten Silbernitratmenge von der Salzsäure befreit. Das Filtrat vom Chlor-silber, dessen Reaction alkalisch war, wurde, nach dem Ausfällen einer darin noch vorhandenen Spur von Silber mittelst Schwefelwasserstoff, mit Salpetersäure neutralisirt und sodann im Wasserbade eingeeengt. Diese Flüssigkeit lieferte bald Arginin-nitratkrystalle in grosser Quantität. Aus der Mutterlauge liess

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 182.

2) Man vergleiche die vorhergehende Abhandlung.

3) Diese Formel ist von Hedin für das Histidinsilber aufgestellt worden.

sich noch etwas Arginin durch Ausfällen mit Silbernitrat und Barytwasser gewinnen.

In dem Filtrat von dem durch die zuletzt genannten Reagentien hervorgebrachten Niederschlage war nun das Lysin zu suchen. Ich versetzte dieses Filtrat, nachdem es mittelst Salzsäure von einem Silberrest befreit worden war, mit Phosphorwolframsäure, wobei ein ziemlich starker Niederschlag entstand. Da die bei Zerlegung dieses Niederschlags durch Baryt in bekannter Weise erhaltene Basenlösung etwas Kali enthielt,¹⁾ so machte ich sie mit Weinsäure stark sauer, engte sie im Wasserbade stark ein und fügte dann etwas Weingeist zu. Nachdem das so zur Ausscheidung gebrachte Kaliumbitartrat abfiltrirt worden war, befreite ich die Flüssigkeit durch Eindunsten vom Weingeist und fügte dann wieder Phosphorwolframsäure zu. Der dadurch erzeugte Niederschlag wurde wieder mit Baryt zerlegt, die so erhaltene Basenlösung vom Baryt befreit, im Wasserbade stark eingengt und sodann mit einer alkoholischen Pikrinsäurelösung neutralisirt. Nach kurzer Zeit schied sich ein Pikrat in feinen gelben Krystallen aus. Die davon abfiltrirte Mutterlauge lieferte beim Verdunsten ein Pikrat von ganz anderem Aussehen, welches ich nicht weiter untersucht habe.

Das zuerst ausgeschiedene Pikrat wurde aus Wasser umkrystallisirt; es zeigte das Aussehen des Lysinpikrats. Ich verwandelte es durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether nach Kossel's Vorschrift in das Chlorhydrat. Das letztere blieb beim Verdunsten der wässerigen Lösung krystallinisch zurück; es löste sich leicht in Methylalkohol. Ich versetzte seine concentrirte wässrige Lösung mit Platinchlorid und fügte dann absoluten Alkohol zu. Im Verlauf von einigen Stunden schied sich ein Chloroplatinat in schönen rothgelben Prismen aus. Im Aussehen stimmte dieses Salz vollständig mit dem bei Untersuchung der Spaltungsprodukte des Coniferenproteins erhaltenen Lysinplatinchlorid²⁾ überein und ver-

1) Die Niederschläge, welche durch Phosphorwolframsäure in den wässerigen Keimpflanzenextracten hervorgebracht werden, enthalten in der Regel etwas Kali.

2) Man vergleiche die vorhergehende Abhandlung.

nielt sich auch beim Trocknen über Schwefelsäure ebenso wie das letztere. Die Analyse gab für den Platingehalt des zuerst bei 100°, dann noch bei 130° getrockneten Salzes Zahlen, welche der Formel $C_6H_{14}N_2O_2$, 2HCl, $PtCl_4$ entsprechen, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:

	1.	0,2030 g Substanz gaben	0,0715 g Pt.
	2.	0,2000 „ „ „	0,0700 „ „
		Gefunden:	
	Berechnet:	1.	2.
Pt	35,05 %	35,22 %	35,00 %

Die Identität dieses Chloroplatinats mit dem bei Verarbeitung der Spaltungsprodukte des Coniferenproteins erhaltenen Lysinplatinchlorid wird noch dadurch bewiesen, dass die beiden Salze bei gleichzeitigem Erhitzen in Capillarröhrchen bei der gleichen Temperatur (219—220°) schmolzen.¹⁾

Aus diesen Thatsachen ist zu schliessen, dass die von mir untersuchten Keimpflanzen neben Arginin und Histidin auch Lysin enthielten.

Was die Ausbeute an diesen drei Basen betrifft, so lieferten 560 g lufttrockener Cotyledonen ungefähr 45 g Arginin-nitrat, 2,5 g Histidinchlorid und 1 g Lysin-pikrat; die zur Abscheidung gebrachten Histidin- und Lysinmengen waren also nur gering gegenüber der sehr grossen Argininquantität. Aus obigen Zahlen kann man aber noch keinen Schluss auf das Mengenverhältniss machen, in welchem beim Eiweisszerfall in den Keimpflanzen die genannten drei Basen nebeneinander entstanden waren. Denn zur Darstellung dieser Basen habe ich ja nur den Rückstand verwendet, welcher bei Behandlung der gepulverten Cotyledonen mit kochendem Weingeist geblieben war; es ist aber denkbar, dass der Weingeist einen Theil der Basen gelöst hatte, und zwar vom Lysin und Histidin mehr als vom Arginin. Ferner liegt es im Bereich der Möglichkeit, dass im Stoffwechsel der Keimpflanzen die zuerst genannten beiden Basen rascher umgewandelt werden, als das Arginin.

¹⁾ Ohne Zweifel schmolz das Chloroplatinat unter Zersetzung; sein Schmelzpunkt ist daher vermuthlich kein constanter.

Es ist noch zu erwähnen, dass ich auch in den Cotyledonen 6—7tägiger Keimpflanzen von *Lupinus luteus* Histidin neben Arginin nachzuweisen vermochte; ob die beiden Basen auch hier von Lysin begleitet waren, wurde nicht untersucht. Das aus dem Quecksilberchloridniederschlag dargestellte Histidinchlorid wurde wieder durch eine auf meine Bitte von Herrn Professor U. Grubenmann ausgeführten krystallographischen Untersuchung identificirt.

Die Versuche, deren Ergebnisse ich im Vorigen mitgetheilt habe, bilden eine Ergänzung der von mir und meinen Mitarbeitern über die stickstoffhaltigen Bestandtheile der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* früher ausgeführten Untersuchungen. In den genannten Keimpflanzen sind nun im Ganzen acht Stickstoffverbindungen nachgewiesen worden, die man als Produkte des Eiweissumsatzes betrachten kann, nämlich Asparagin, Leucin, Amidovaleriansäure, Tyrosin, Phenylalanin, Arginin, Histidin und Lysin. Leucin und Tyrosin vermochte ich nur aus Pflänzchen abzuscheiden, deren Vegetationszeit nur ca. eine Woche betragen hatte.

Beitrag zur Kenntniss einiger Eigenschaften des Glutins.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 30. August 1899.)

Nicht nur die chemische Constitution des Glutins — im eigentlichen Sinne dieses Ausdrucks — ist eine Frage, deren endgültige Entscheidung wir wegen ihrer überaus complicirten und die Forschung erschwerenden Beschaffenheit wohl erst in ferner Zukunft erhoffen dürfen; auch gewisse andere auf diesen Stoff bezügliche Fragen mehr unmittelbarer Natur, die Isolirungstechnik, die elementare Zusammensetzung, die Färbungs- und Fällungsreactionen, die Gelatinirung u. dergl. betreffend, harren noch einer genaueren Erörterung. Hinsichtlich mehrerer dieser, bei dem heutigen Standpunkte der Wissenschaft keineswegs unergründbaren Verhältnisse waltet indes gegenwärtig eine so offenbare Unsicherheit ob, dass man z. B. bei dem Studium der in den letzten Jahren erschienenen Lehrbücher der physiologischen Chemie Schwierigkeiten hat, sich hierin eine bestimmte Auffassung zu bilden.

Angesichts dieser Sachlage habe ich das Glutin zum Gegenstand einer Untersuchung in einigen oben angedeuteten Beziehungen gewählt. Nachstehend gebe ich eine Darstellung der gewonnenen Ergebnisse.

1. Isolirung.

Bei der Isolirung des Glutins sind besondere Massregeln nöthig zur Entfernung von Stoffen, welche — gewöhnlich zu mehreren — regelmässig in jedem ursprünglichen Collagen-

material vorkommen und, falls die erforderliche Umsicht ausser Acht gelassen wird, auch in das Glutinpräparat übergehen. Unter diesen natürlichen Verunreinigungen des Glutins sind anzuführen Eiweiss-, Proteid- (in erster Reihe Mucin- und Nuklein-Substanzen, ferner Chondroitinschwefelsäure. Hierbei stehen zwei Wege offen: die hauptsächlichste Reinigung kann entweder schon bei dem Collagen selbst oder erst bei dem fertigen Glutin vorgenommen werden, mit anderen Worten, entweder vor oder nach jener Procedur, durch die das Collagen in Glutin übergeführt wird. Im Anschluss an van Name (Z S. 119) hege ich die Ueberzeugung, dass das erstere Verfahren das rationellste ist, da es am sichersten zum Ziele führt, und zwar ist es ganz entschieden dann vorzuziehen, wenn die Darstellung möglichst reinen Glutins aus einem gegebenen Kollagenmaterial bezweckt wird. Andererseits ergibt meines Erachtens auch das letztere Verfahren ein durchaus befriedigendes Resultat, was ja bei solchen Arbeiten sehr erwünscht ist, für die eine grössere Menge Glutins erforderlich ist, da man für diesen Fall irgend eins der im Handel billig zu erhaltenden und mit kräftigem Gelatinierungsvermögen ausgerüsteten «Gelatinepräparate verwenden kann.

Im Allgemeinen bedient man sich bei der Reinigung der Gelatine nur des Wassers¹⁾ als Auswaschungsflüssigkeit, bisweilen ausserdem einer Kochsalzlösung.²⁾ Obschon diese Flüssigkeiten die obenerwähnten, verunreinigenden Substanzen zu lösen im Stande sind, wirken sie doch in dieser Hinsicht nicht so kräftig, dass sie ein reines Präparat garantiren. Weit aus zuverlässiger wäre eine alkalische Extractionsflüssigkeit.

Durch die Angaben der Lehrbücher, dass das Glutin in alkalischen Flüssigkeiten leicht löslich sei,³⁾ beeinflusst, er-

1) Lehmann, T S. 374; Fr. Hofmeister, P S. 302; Chittenden u. Solley, D; Dastre u. Floresco, E S. 706; Hammarsten, N S. 48.

2) Neumeister, A S. 47.

3) Kühne äussert z. B. (S S. 357): «In kaltem Wasser quillt der trockene Leim auf, ohne sich zu lösen. Sehr geringe Mengen von Alkalien [vom Verf. cursiv] oder Säuren dem Wasser zugesetzt, bewirken jedoch die Lösung schon in der Kälte».

wartete ich Anfangs von einem solchen Verfahren nichts, da ich befürchtete, dass das Glutin dem Beispiel der Verunreinigungen folgen, d. h. sich lösen würde. Demgemäss bediente ich mich bei meinem ersten diesbezüglichen Versuche einer 0,025%igen Kalilauge, wobei das Auslaugen überdies bei einer wenig über 0° C. betragenden Temperatur und während der Dauer von nur 24 Stunden stattfand. Der Versuch fiel indes glücklich aus: die Gelatine hatte sich nicht merklich gelöst. Weitere Versuche ergaben, dass das Glutin einer nicht unerheblichen Resistenz gegen die Einwirkung von Kalilauge fähig ist, so dass nicht nur deren Stärke bis auf 0,2–0,5% gebracht, sondern das Auslaugen sogar bei Zimmertemperatur geschehen und die Dauer auf ein paar Wochen ausgedehnt werden konnte. Obgleich nun aber das Ergebniss dieser Alkalibehandlung insofern ein gutes war, als das freilich stark gequollene Glutin grösstentheils ungelöst verblieb und unschwer gesammelt werden konnte, so lag immerhin die Befürchtung nahe, dass das Glutin doch wohl vielleicht in chemischer Beziehung irgendwie habe verändert werden können. Diese Befürchtung wurde jedoch aufgehoben, da Gelatinierungsversuche ergaben, dass das mit Alkali behandelte Glutin dieselbe vorzügliche Gelatinierungsfähigkeit besass, wie die ursprüngliche Gelatine: 1%ige Lösungen lieferten in beiden Fällen feste Gallerte. Eine chemische Veränderung würde sich nothwendiger Weise durch eine geschwächte oder verloren gegangene Gelatinierungsfähigkeit zu erkennen gegeben haben, da eben diese Eigenschaft des Glutins bei verschiedenartigen chemischen Eingriffen bekanntlich frühzeitig zu Grunde geht.¹⁾

1) Dass keine chemische Veränderung eingetreten war, wurde übrigens durch das Ergebniss der Schwefelbestimmungen erhärtet, welche an Glutinpräparaten ausgeführt wurden, die, aus demselben Gelatinmaterial stammend, einer weit verschiedenen Kalibehandlung unterzogen worden waren. Drei Glutinpräparate, für deren Herstellung resp. 0,1% Kalilauge während 1 Tages, 0,2% Kalilauge während 20 Tage und 0,5% Kalilauge während 10 Tage verwendet worden, ergaben den gleichen Schwefelgehalt: 0,20% (siehe S. 478). Eine etwaige chemische Veränderung des Glutins sollte Variationen des Schwefelgehaltes bei dem Endprodukte hervorgerufen haben.

Zwecks effektiver Reinigung der Gelatine schlage ich demnach folgendes Verfahren vor:

Die Gelatinescheibchen werden während einiger Tage mit ätherhaltigem destillirtem Wasser¹⁾ ausgewaschen, dann mit Kalilauge (von 1 bis ein paar Zehntel $\frac{0}{10}$) während einiger Wochen, oder bis die Gallerte so locker geworden, dass bei ihrem Durchsieben ein nennenswerther Verlust eintritt, darnach mit destillirtem Wasser, sehr verdünnter Essigsäure und schliesslich wieder mit destillirtem Wasser. Das Auswaschen findet bei Zimmertemperatur statt; die Erneuerung der Extraktionsflüssigkeit — 1 Liter pro 25–50 g Gelatin — geschieht täglich oder jeden zweiten Tag, wobei die Gallerte z. B. vermittels eines porzellanenen Siebes gesammelt wird. Nachdem die stark gequollene Gallerte mit Alkohol gehärtet worden,² erhält man die Glutininmasse in erstarrtem Zustande; dieselbe kann, falls der specielle Zweck dies benöthigt, wiederum durch Lösen in warmem Wasser, Filtriren, Ausfällen mit Alkohol, Trocknen, Pulverisiren, Extrahiren mit Aether u. s. w. behandelt werden. Als Endprodukt erhält man bei diesem Verfahren ein Glutin, welches eine beachtenswerthe Garantie für die Abwesenheit nahezu jeder denkbaren Verunreinigung darbietet — ausgenommen einen gewöhnlich nicht hochgradigen ($0,25$ – $0,75$ $\frac{0}{10}$) Gehalt an mineralischen Bestandtheilen — und welches zugleich keiner chemischen Veränderung unterzogen worden.

Wünscht man das demgemäss von organischen, fremden Stoffen befreite Glutin möglichst aschearm darzustellen³⁾, so

1) Der Zusatz des Aethers hat ausschliesslich antiseptischen Zweck. Wenn in der Folge destillirtes Wasser bei Extraktionsversuchen erwähnt wird, ist ätherhaltiges gemeint.

2) Gewöhnlich ist 2–3malige Erneuerung des Alkohols von Nöthen, um die bedeutende Menge imbibirten Wassers zu extrahiren.

3) Es dürfte nahezu unmöglich sein, durch direkt unternommene protahirte Wasserextraktion der nach beendeter Alkalibehandlung stark gequollenen und bei dem — behufs Erneuerns der Flüssigkeit nöthigen — Durchsieben in immer kleinere Stückchen zerfallenden Gallerte einen höheren Grad von Aschefreiheit zu gewinnen, und zwar aus dem Grunde, dass das Material in Folge des Verlustes beim Durchsieben gleichsam unter den Händen schwindet. Die Härtung im Alkohol bezweckt eben, die Substanz der weiteren Handhabung zugänglich zu machen.

wird in der Wärme eine starke (10—15%) wässrige Lösung bereitet und behufs Gelatinirens abseits gestellt. Die Gallerte wird in dünne Scheibchen zerschnitten, welche Wochen hindurch mit reichlichem, oftmals erneuertem (ätherhaltigem) destillirtem Wasser ausgewaschen werden. Der Gehalt an Asche wurde hierdurch bei zwei Darstellungen — von 1,87% in der ursprünglichen Gelatine — auf 0,16 bezw. 0,13% im Glutinpräparate herabgesetzt.

Nachtrag. Nachdem die experimentellen Arbeiten für diese Abhandlung bereits beendet waren, habe ich erfahren, dass auch in einem anderen Falle behufs Reinigens von der Gelatine eine alkalische Extractionsflüssigkeit zur Verwendung gelangte. In seiner 1898 erschienenen Inaugural-Dissertation (G S. 6) theilt nämlich Faust mit, dass er (ausser Wasser, verdünnter Essigsäure und Chlornatriumlösung) verdünntes Ammoniak verwendete. Diese Anwendung verdünnten Ammoniaks ist zweifelsohne ein Fortschritt; es dürfte jedoch, insbesondere bei nur eintägigem¹⁾ Gebrauch, hinsichtlich des Effects nicht der andauernden (10—20 Tage langen) Extraction mit fixem Alkali (Kali- oder Natronlauge) gleichkommen, da letzteres in der Fähigkeit, Proteinstoffe zu lösen, das Ammoniak beträchtlich übertrifft, ein Unterschied, der — um auf einen bestimmten Fall hinzuweisen — in Bezug auf die Albumoidsubstanz der Linsenfasern zu Tage tritt (Verf. V S. 74).

2. Schwefelgehalt.

Die Frage nach dem Schwefelgehalt des Glutins (resp. des Collagens) ist von verschiedenen Forschern sehr abweichend beurtheilt worden. Einige vertreten z. B. die Ansicht, dass das chemisch reine Glutin ein schwefelfreier Körper sei, mit andern Worten, dass der Schwefel ein dem Glutininmolekül fremdes Element sei, welches einer zufälligen Verunreinigung zu verdanken sei, wenn man es im Glutinpräparate vorfände.

1) « — — — dann das Wasser abgegossen, frisches zugegeben, etwas Ammoniak zugesetzt und nach 24stündigem Stehen [cursiv. vom Verf.] mit — — — Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction ausgewaschen. » (Faust loc. cit.)

In diesem Sinne äussern sich, direkt oder indirekt, die älteren Forscher¹⁾ insgemein, aber auch bei späteren stösst man auf indirekte diesbezügliche Aussagen (Schützenberger u. Bourgeois, F' S. 262; Fr. Hofmeister, P S. 322 oder ohne irgend welchen Vorbehalt angeführte Citate (Hjelt u. Aschan, O S. 952).

Kein heutiger²⁾ Chemiker, welcher die Sache selber geprüft hat, dürfte indes Anlass finden, den Schwefelgehalt des reinen Glutins anzuzweifeln. Nur in Bezug auf die Grösse dieses Schwefelgehalts hat das Urtheil noch nicht die erwünschte Festigkeit erlangt.

Verdeil (H S. 322) fand im Hausenblasecollagen 0,69^o Schwefel; Schlieper (D' S. 379) in demselben Material 0,56^o; Chittenden u. Solley (D S. 23) in gereinigter Gelatine 0,71^o; Verf. (W S. 135) im Fischschuppenglutin 0,52^o; Faust (G S. 7ff.) in gereinigter Gelatine 0,49^o, in Gelatine, die aus der Kopfhaut des Kalbes hergestellt war, 0,48^o und im Hausenblaseglutin 0,46^o. Aehnlich verhalten sich die in den Lehrbüchern allgemein vorkommenden Angaben: 0,56^o Schwefel geben Gorup-Besanez (I S. 142) und Hammarsten (N S. 46) an; 0,6^o findet man bei Kühne (S S. 357) und Neumeister (Ä S. 46).³⁾

1) Berzelius, A S. 812; Scherer, B' S. 46; Godoever, J S. 63; Mulder, Y S. 206. — Ausnahmen sind jedoch vorhanden (Verdeil, H' S. 322; Schlieper, D').

2) Es scheint ganz besonders bezeichnend für die älteren Forscher zu sein, dass sie durchgehends die Bedeutung des Schwefels als eines wichtigen kennzeichnenden Constituenten des Moleküls der meisten Proteinstoffe unterschätzt haben. Das Mucin wird beispielsweise noch im Lehrbuch von Gorup-Besanez aus dem Jahre 1878 (I S. 133), wo er sich auf die Untersuchungen Scherer's (C' S. 199), Eichwald's (F S. 192) und Obolensky's (Ö S. 591) stützt, als schwefelfrei aufgeführt; und das Elastin wurde erst ganz neulich in Folge der Arbeiten von Chittenden u. Hart (C S. 371) und vor Allem derjenigen von Schwartz (G' S. 505) als schwefelhaltiger Körper anerkannt. Diese den Schwefel verkennende Richtung wurde auch von der bekannten Mulder'schen Proteintheorie innegehalten (X S. 138).

3) Neumeister gibt mit den Worten: «Seine Zusammensetzung beträgt nach den Analysen von Franz Hofmeister (Ueber die chem.

Einem ganz anderen Typus gehören die aus einigen anderen Untersuchungen gewonnenen Schwefelwerthe an. Im Glutin (und Collagen) der Rinderhornhaut fand Verf. (V S. 225) 0,30 ‰; van Name (Z S. 124) erzielte aus dem Sehnenglutin des Rindes 0,25 ‰, und Verf. letzthin aus gereinigter Gelatine 0,20 ‰.

Ueber die letztere, bisher nicht veröffentlichte Beobachtung mag hier näher berichtet werden. Um das Verhalten des Glutinschwefels bei der Oxydation zu studiren, benöthigte ich eines grösseren Quantum möglichst reinen, besonders von Sulfaten und sonstigen schwefelhaltigen Verunreinigungen freien Materials. Da ich bemerkt hatte, dass jede käufliche Gelatine grössere oder geringere Sulfatmengen¹⁾ enthält, nahm ich eine orientirende Prüfung vor mit 11 im Handel erhältlichen Sorten, um zu ermitteln, welche von diesen den geringsten Sulfatgehalt besitze; zugleich wurde vergleichende Prüfung der Gelatinirungsfähigkeit der einzelnen Sorten ausgeführt. Nachdem durch dieses Verfahren eine Gelatinesorte²⁾ (— mit Rücksicht auf ihren relativ geringen Sulfatgehalt die beste der 11 Proben und mit Rücksicht auf ihre gute Gelatinirungsfähigkeit die drittbeste der 11 Proben) ausgewählt war, wurde daraus bei einem

Structur des Collagens, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. II, 1879, S. 322) im Mittel: 50,75 ‰ C, 6,47 ‰ H, 17,86 ‰ N, 24,32 ‰ O und 0,6 ‰ S. den Schwefelgehalt 0,6 ‰ als von Hofmeister dargethan an. Dem ist jedoch nicht ganz so, da dieser Forscher in der citirten Arbeit des Schwefelgehalts des Collagens (bezw. Glutins) mit keinem einzigen Wort erwähnt, somit indirekt seine Auffassung des Glutins als eines schwefelfreien Körpers kundgebend. Der von Hofmeister selbst angegebene Werth für O beträgt 24,92 ‰ — nicht wie Neumeister ihn angibt 24,32 ‰ —, und wenn man ihn zu den C-, H- und N-Werthen addirt, wird die Summe denn auch genau 100 ‰.

1) Grösstentheils aus dem bei der Fabrikation verwendeten Wasser stammend.

Vor ein paar Jahren fand ich ein dem Aussehen nach schönes und hinsichtlich seiner Freiheit von fremden organischen Stoffen untadeliges Gelatinepräparat, das infolge starker Verunreinigung durch Sulfat Schwefelwerthe lieferte, welche sogar über 1 ‰ hinausgingen (bei 2 Analysen 1,02 bezw. 1,05 ‰).

2) Handelsmarke: «WH Nr. 1866. Qualität Extra Gelatine» (Golddruck.)

anfänglichen Versuche ein Glutinpräparat (Nr. I) durch 24stündiges Auslaugen mit 0,1%iger Kalilauge und 7tägiges Auswaschen mit destillirtem Wasser resp. verdünnter Essigsäure dargestellt. Die Analyse ergab 0,19% Schwefel.¹⁾ Dieser auffallend niedrige Werth legte anfänglich die Vermuthung eines Analysenfehlers²⁾ nahe, seine Richtigkeit wurde jedoch von zwei weiteren Bestimmungen, die 0,20% ergaben, bestätigt. Unwillkürlich warf sich die Frage auf, ob dasselbe Gelatinematerial bei grösserer Energie der Kalibehandlung wohl noch schwefelärmere oder vielleicht gar gänzlich schwefelfreie Glutinpräparate liefern möchte. Um dies zu ermitteln, wurden 5 Versuche mit verschiedenartiger Intensität der Kalieinwirkung angestellt. Aus jedem Versuche ging ein Glutinpräparat hervor (Nr. II—VI), das auf seinen Schwefelgehalt hin analysirt wurde. Die Anordnung des Reinigungsverfahrens nebst den Ergebnissen der Analyse sind aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich.

Nr. des Glutin- präparates	Auswaschung während in s e s a m m t (Tage)	Auswaschung mit Kalilauge während (Tage)	Concentration der Kalilauge (%)	Schwefel- gehalt des Glutins (%)
I	8	1	0,1	0,20
II	12	4	0,1	0,20
III	12	8	0,1	0,18
IV	26	20	0,1	0,20
V	26	20	0,2	0,20
VI	16	10	0,5	0,20

1) Hier und in der Folge werden die Analysenresultate auf aschefreie Trockensubstanz berechnet angegeben. Bei sämtlichen Schwefelbestimmungen bediente ich mich der von Hammarsten (L S. 283 ff.) auf ihre Fehlerquellen hin so sorgfältig kontrollirten Liebig'schen Methode. Von dem Untersuchungsmaterial wurden per Analyse etwa 2,0 g, in keinem Falle weniger als 1,8 g verbraucht. (Als weniger angemessen ist zu bezeichnen, dass Faust (G) bei Schwefelbestimmungen in Bezug auf ein so schwefelarmes Material, wie das Glutin es ist, sich öfters mit einer Quantität von 0,5—0,6 g, ja einmal mit nur kaum 0,4 g per Analyse, begnügt.)

2) Die obenwähnte. in einer neuen amerikanischen Zeitschrift erschienene Arbeit van Name's war mir damals nicht bekannt. Erst nach Abschluss der einschlägigen Laboratorienarbeiten erfuhr ich von

destillirtem Wasser während 12 Tage gemacht; das erhaltene Glutinpräparat (Nr. VII) enthielt 0,22 % Schwefel.¹⁾ Die Untersuchung des diesen Glutinpräparaten zu Grunde liegenden Materials (Gelatine),²⁾ das notorisch sulfathaltig war, ergab einen Schwefelgehalt von nur 0,49 %.

Was ist nun aus diesen Versuchen zu folgern?

1. Dass in den gegebenen Fällen der für das Glutin allgemein angenommene Schwefelgehalt von 0,5—0,6 % unter keinerlei Umständen zu erreichen war.

2. Dass der in diesem Fall beobachtete niedrige Gehalt an Schwefel nicht auf das Reinigungsverfahren (Kalibehandlung) zurückzuführen war, da im Grossen und Ganzen schon durch die einfache Extraction mit Wasser derselbe Schwefelwerth erzielt wurde, dass es mit anderen Worten in diesem Falle des Verfahrens mit alkalischer Extractionsflüssigkeit nicht bedurfte, um ein von fremden, organischen schwefelhaltigen Substanzen (Eiweissstoffen u. A.) freies Präparat zu gewinnen.

3. Dass demnach im Handel zufällig Gelatine von solcher Beschaffenheit angetroffen wird, dass sie nach einfacher Extraction mit Wasser einen ebenso niedrigen³⁾ Schwefelgehalt ergibt, wie er überhaupt bisher bei irgend einem mit der grössten Sorgfalt gereinigten Glutin hat erzielt werden können.

4. Dass der hier gefundene niedrige Gehalt an Schwefel — da er den äusserst verschiedenen Intensitätsgraden der

ihrer Existenz; der gütigen Vermittlung der Herren Prof. Zuntz und Dr. Loewy verdanke ich die Beschaffung des fraglichen Heftes jener im hiesigen Lande nicht zugänglichen Zeitschrift.

1) Die Präparate I—VII zeigten dieselbe vorzügliche Gelatinirungsfähigkeit, wie die ursprüngliche Gelatine, und zwar bei der Prüfung von resp. 1 %igen Lösungen.

2) Als Präparat Nr. VIII beziffert.

3) Die Aussage van Name's (Z. S. 126): «In the content of sulphur however, there is a wide difference [from commercial gelatin], pure gelatin from tendons containing only 0,25 per cent of this element» ist freilich im Grossen und Ganzen richtig, auf jeden einzelnen Fall aber nicht zutreffend.

Alkalieinwirkung gegenüber gar keine entsprechende Schwankung andeutet — nicht auf rückständige schwefelhaltige Verunreinigungen zurückzuführen ist, sondern im Glutin selbst fest gebunden ist und demnach das Vorhandensein eines schwefelfreien Glutins entschieden verneint.

Bei einem Blick auf die bisher betreffs des Schwefelgehalts des Glutins mitgetheilten Werthe fällt es in die Augen, dass die bei verschiedenen Gelegenheiten und an verschiedenem Materiale beobachteten Schwefelwerthe sich auf zwei verhältnissmässig abgegrenzte Gruppen vertheilen, deren eine etwa $\frac{1}{4}\%$, die andere den doppelten Betrag, $\frac{1}{2}\%$, darweist.

Ebenso gewiss, wie das Vorhandensein jenes niedrigeren Schwefelgehaltes (etwa $\frac{1}{4}\%$) nachgewiesen worden (von van Name und Verf.), ebenso unmöglich ist es, die Gültigkeit des höheren Gehalts (etwa $\frac{1}{2}\%$) mit der Muthmassung von der Hand zu weisen, dass das infolge der Analyse zu der letzteren Kategorie zu rechnende Glutin nach sorgfältigerem Reinigen Schwefelwerthe des niedrigeren Typus gezeigt haben würde. Um beispielsweise das vom Verf. (W) studirte Fischschuppenglutin zu erwähnen, so sei daran erinnert, dass dieses einen durchschnittlich $0,52\%$ betragenden Schwefelwerth enthaltende Glutin aus einem Material dargestellt wurde, welches in seiner physikalischen Beschaffenheit (äusserst dünne Lamellen, ganz besonders günstige Bedingungen für effectives Auswaschen des Collagens vor dessen Glutinwandlung darbietet, und dass ein sorgfältiges Auswaschen ihm denn auch thatsächlich bei der Herstellung des Analysenmaterials zu Theil wurde (l. c. S. 128). Betreffs der Mehrzahl der oben (S. 476) citirten Glutinschwefelwerthe (annähernd $0,6\%$), welche aus nur mit Wasser gereinigtem Material gewonnen wurden, mag wohl anzunehmen sein, dass sie bei sorgfältigerem Reinigen, z. B. mit der oben vorgeschlagenen Alkalibehandlung, ein wenig niedriger geworden sein möchten und sich also dem Werthe $0,5\%$ etwas mehr genähert hätten; dass sie aber durch ein weiteres, an dem Materiale — dem ursprünglichen Collagen oder dem fertigen Glutin — angebrachtes Reinigungsverfahren bis auf die Zone der niedrigeren Werthe hätten reducirt werden können.

Schwefelwerthe in Erwägung zu ziehen, welche, nur mit wenigen Hundertstel Procent unter 0,5% hinabgehend, bei der Analyse ausserordentlich sorgfältig gereinigter Präparate verschiedener Herstammung gewonnen worden sind. In diesen Werthen (0,49, 0,48 bezw. 0,46), einschliesslich des vom Verf. für das Fischschuppenglutin erzielten Werthes, 0,52%, glaube ich einen ungefähr exacten Ausdruck für die höheren Glutinschwefelwerthe erblicken zu dürfen.

Kurz, der Thatsache, dass die bisher nachgewiesenen Werthe des Glutinschwefels im Ganzen sich einem der beiden Werthe $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ % anschliessen, während dazwischen eine, freilich recht begrenzte, freie Zone gelegen ist, entnehme ich den Anlass, die Hypothese aufzustellen, dass es in Bezug auf die Grösse des Schwefelgehalts zwei Typen Collagen bezw. Glutin gibt, die sich von einander dadurch unterscheiden, dass der eine 1 Atom Schwefel im Molekül gegenüber 2 Atomen bei dem anderen, oder vorsichtiger ausgedrückt, nur halb so viele Schwefelatome wie der andere enthält. Insofern

1) Anderer Meinung ist offenbar van Name (Z. S. 124), der, nachdem er das Vorhandensein eines Glutins mit 0,25 % Schwefelgehalt nachgewiesen, hieraus folgert: «Undoubtly the small percentage of sulphur, as contrasted with those in the older analyses [0,6 %] is due to the more complete removal of mucin [vom Verf. cur-sivirt] in these preparation, for, as been recently found, the sulphur-content of mucin from tendons is quite high, 2,32 per cent.»

Gegen eine solche Deutung der Thatsachen muss ich jedoch Einspruch erheben. Man bedenke, dass eine durch Verunreinigung mit organischer, schwefelhaltiger Substanz bewirkte Steigerung des Schwefelgehalts eines Glutinpräparats von dem als das Richtige supponirten Werthe 0,25 bis auf 0,6 % — gesetzt, dass die Verunreinigung sogar den hohen Schwefelgehalt von 2,3 % besässe — immerhin etwa 17 % der fremden Substanz erheischen müsste, und dass eine so hochgradige Verunreinigung sich natürlich nicht der Entdeckung sollte haben entziehen können bei der Untersuchung der qualitativen Reactionen des Präparates. (Prüfung der Fällbarkeit Säuren gegenüber, auf bleischwärenden Schwefel, auf reducirende Substanz nach Kochen mit verdünnter Mineralsäure u. s. w.).

erscheint diese Annahme ansprechend, als mit ihrer Guttheissung der Widerspruch zwischen den auf diesem Gebiete bisher gemachten Beobachtungen wesentlich vermindert wird. Falls diese Zerlegung sich als zutreffend erweist, wäre die durch eine Untersuchung gut gereinigten Glutins mit bekanntem Ursprung zu gewinnende Feststellung des Verbreitungsgebietes jedes dieser zwei Typen von Interesse.

Wenn künftige Untersuchungen nun auch bestätigen sollten, dass man mit Recht zwischen — um eine alterthümliche Ausdrucksweise zu gebrauchen — «einfach geschwefeltem» und «doppelt geschwefeltem» Glutin unterscheiden könne, so ist daraus aber nicht zu folgern, dass die Schwefelatome der letzteren Art in ihrer Bindungsform untereinander verschieden sein müssen. Im Gegentheil sprechen alle bisher bekannten Verhältnisse dafür, dass der Schwefel bei jedem gut gereinigten Glutin, ganz abgesehen davon, ob er in dem $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{2}^0$ näher liegenden Betrage darin vorkommt, in sogen. fester¹⁾ Bindung vorhanden ist, da die Prüfung mit alkalischer Bleilösung — in Bezug hierauf waltet völlige Einigkeit in der Litteratur — stets negativ ausgefallen ist.

Als experimentellen Beweis der ausserordentlich festen,

¹⁾ Der «fest»gebundene Schwefel, der eine geraume Zeit lang auch als «oxydirter» bezeichnet wird — im Gegensatz zu dem «lose» gebundenen Schwefel, welcher, obschon eine Collectivbezeichnung mehrerer verschiedener Bindungsarten ausmachend, dennoch den Beinamen «un-oxydirter» für sich beanspruchen könnte —, sollte nicht mehr mit diesem Adjectiv («oxydirter») vereint werden, da es nunmehr immer offener geworden, dass hier (in Bezug auf Proteinstoffe überhaupt) von keinem an Sauerstoff gebundenen Schwefel die Rede ist, sondern von der Bindung dieses Elements innerhalb der Merkaptangruppe, einer Bindungsform, die mit den Sauerstoffverbindungen des Schwefels die Eigenschaft gemeinsam hat, dass sie mit alkalischer Bleilösung nicht reagirt.

Wenn van Name (Z S. 125) in dem Satze «Further the above samples of gelatin give no reaction for mercaptan-sulphur with plumbic acetate and potassium hydroxide» jene Schwefelbindungsform, welche mit alkalischer Bleilösung reagirt, als Merkaptanschwefel bezeichnet, so ist dies wohl nur als eine unabsichtliche Verwechslung des Ausdrucks zu betrachten.

organischen Bindung des Schwefels im oben erwähnten, 0,20% Schwefel enthaltenden Glutin sei beiläufig das Ergebniss einiger Oxydationsversuche erwähnt.¹⁾

Versuchsnummer	Oxydationsmittel	Gewonnene Menge BaSO ₄ g	Oxydirt Schwefel %
1.	Conc. Salpetersäure (Spec. Gew. 1,39)	0,007	0,019
2.	Rauch. Salpeters. (Spec. Gew. 1,50)	0,0045	0,012
3.	Conc. Königswasser (= 1 Vol. rauch. Salpeters. + 3 Vol. conc. Salzsäure vom spec. Gew. 1,19)	0,0065	0,018

Trotz der wohlbekannten Energie der benutzten Reactionsmittel, die sogar in reichlichem Ueberschuss und unter Erhitzung zur Verwendung kamen, war also nur ein geringer Bruchtheil des Glutinschwefels zu Schwefelsäure oxydirt worden: von den ursprünglichen 0,20% entzogen sich 0,18—0,19% einer solchen Einwirkung. Eine andere Frage wirft sich auf, welches Schicksal die Hauptmasse des Schwefels in Folge der bei jener energischen Behandlung unvermeidlichen Destruction des Glutinmoleküls erlitten hat. Obgleich meine daraufhin

1) Bei jedem Versuche gelangte eine so grosse Menge des Glutinpräparats Nr. I zur Verwendung, dass sie genau 5 g aschefreier Trockensubstanz entsprach. In einem mit einem Uhrglase überdeckten Glasbecher wurde jede solche Portion mit 75 ccm. der betreffenden Oxydationsflüssigkeit behandelt — die zur Verwendung gelangenden Salpeter- und Salzsäuren waren durch Umdestilliren von jeder Verunreinigung mit Schwefelsäure befreit —, zuerst 24 Stunden in Zimmertemperatur, dann im Sandbade 2 oder mehr Tage (davon ein Weilchen mit der Mischung in vollem Sieden). Je nachdem die Concentration des Inhalts eintrat, wurden die Becher ins Wasserbad gebracht, wo die Verdampfung der Reactionsmischung so lange andauerte, bis ein fester Rückstand gewonnen wurde. Nachdem der Rückstand in der Wärme des Wasserbades mit Salzsäure abgeraucht, wurde unter Beobachtung der bekannten Vorsichtsmassregeln die Menge des während des beschriebenen Verfahrens zu Schwefelsäure oxydirten Schwefels bestimmt.

unternommenen Versuche wegen der technischen Schwierigkeiten bei der Isolirung des schwefelhaltigen Endproduktes noch keinen Abschluss gefunden, und man demnach nicht behaupten darf, dass das Resultat endgültig festgestellt sei, will ich indes auf meine bisherigen Beobachtungen gestützt, als höchst wahrscheinlich erklären, dass der Glutinschwefel nach einem Oxydationsverfahren obiger Art hauptsächlich als Methylsulfonsäure, CH_3HSO_3 , wiederzufinden ist.

Anlässlich einer im Lehrbuch Neumeister's (Ä S. 47) vorkommenden Angabe, dass das Glutin, obschon es «den leicht abspaltbaren Schwefel der Eiweisskörper» nicht besitze, bei der Zersetzung mit Salzsäure Schwefelwasserstoff abgebe, habe ich das Glutinpräparat Nr. I daraufhin geprüft, habe aber ein völlig negatives Resultat erhalten. In einem Glaskolben wurde das Glutin mit concentrirter Salzsäure (specifisches Gewicht 1,19) übergossen, und durch den in das lebhaft kochende Wasserbad hinabgesenkten Kolben wurde ein Luftstrom geleitet, der dann durch eine Absorptionsflasche mit Kalilauge hindurchgelassen wurde. Nach einigen Stunden wurde der noch immer alkalische Flascheninhalt mit einem Zusatz von Bleiacetat resp. Nitroprussidnatrium geprüft, ohne dass dadurch eine Sulfidreaction erzielt wurde. Obgleich dieser nur an einem Glutinpräparate ausgeführte Versuch streng genommen nur beweist, dass die Behauptung Neumeister's nicht auf jedes Glutin zutrifft, hege ich dennoch Zweifel, dass es überhaupt gelingen sollte, an irgend einem von fremden, organischen Schwefelverbindungen gut gereinigten Glutin, es möge dem schwefelreicheren oder dem schwefelärmeren Typus angehören, ein entgegengesetztes Resultat zu erlangen.

3. Verhalten zu Millon's Reagens.

Betreffs des Verhaltens des Glutins zu diesem bei physiologisch-chemischen Untersuchungen so fleissig benutzten und in vielen Fällen werthvollen Reagens begegnet Einem allgemein¹⁾ in Specialarbeiten und Lehrbüchern die Angabe, dass eine schwache

¹⁾ Eine isolirte Stellung behauptet in dieser Frage W. Krukenberg (R S. 174), der Einzige, welcher über ein von ihm untersuchtes

Reinigungsmittel, mit anderen Worten, ein positiver Ausfall, wenn schon ein erheblich schwächerer als der von der Prüfung z. B. echter Eiweissstoffe bekannte. Bisweilen wird diese Angabe ohne jedweden Commentar angeführt (Weiske, I' S. 462; F. Hoppe Seyler, Q S. 271), öfters mit einer zurückhaltenden Bemerkung gegenüber der Bedeutung des positiven Ausfalls. Hierbei beobachtet dieser oder jener Autor (Hammarsten, K S. 306; Kühne, S S. 358) eine gewisse Vorsicht, beispielsweise die Möglichkeit oder gar Wahrscheinlichkeit muthmassend, dass der positive Ausschlag nicht dem Glutine selbst angehöre, sondern auf eine Verunreinigung mit anderen Proteinstoffen zurückzuführen sei, während Andere (Neumeister, Ä S. 47;²⁾ Salkowski, A' S. 267)³⁾ mit Bestimmtheit für die Richtigkeit dieser Annahme eintreten.

Dieser unter den wissenschaftlichen Forschern weitverbreiteten Anschauungsweise tritt letzthin van Name (Z S. 128) ganz entschieden entgegen, indem er sich auf die Ergebnisse stützt, welche seine Untersuchungen des vorerwähnten, umsichtig gereinigten, schwefelarmen Glutins geliefert. Er schliesst seine Abhandlung mit folgender, hier in wörtlicher Uebersetzung wiedergegebener Aussage: «Die Reaction fällt allzu kräftig aus, um auf Spuren verunreinigenden Eiweisses bezogen zu werden, wie man sie im Allgemeinen hat deuten wollen. Viel mehr wahrscheinlich ist die Annahme, dass die Atomgruppen — monohydroxylirte Benzolkerne — welche sich durch Rothfärbung mit Millon's Reagens kundgeben, und welche im Eiweissmolekül so reichlich vertreten sind, im Molekül des Glutins verhältnissmässig sparsam vorkommen».

Glutin berichtet, das bei der Prüfung mit dem erwähnten Reagens keine Färbung ergeben haben sollte. Die Darstellung eines so beschaffenen Glutins lässt er auf der lang andauernden Extraction des Collagens mit 5—10%iger Natronlauge und nachfolgendem sorgfältigen Auswaschen mit Wasser beruhen.

2) «. gibt der Leim noch eine schwache Millon'sche Reaction, welche nicht auf das Glutin, sondern auf beigemischtes Eiweiss zu beziehen ist.»

3) «Die geringe Rothfärbung ist auf Beimischung von Albumosen oder Pepton zu beziehen.»

Obgleich ich in einigen anderen auf das Glutin bezüglichen Fragen nicht ganz mit van Name übereinstimme, muss ich ihm in diesem Punkte entschieden beipflichten, und zwar nicht nur deswegen, weil ich schon während früherer Untersuchungen von Glutin verschiedener Herkunft veranlasst gewesen, die Richtigkeit der obwaltenden Meinung anzuzweifeln, sondern besonders deshalb, weil die Prüfungen meiner oben beschriebenen Glutinpräparate mich zu der gleichen Auffassung geführt haben. Folgender diesbezüglicher Versuch war dabei entscheidend.

Von den Glutinpräparaten Nr. I—VI (mit Kali behandelt), Nr. VII (nur mit Wasser extrahirt) und Nr. VIII (die ursprüngliche Gelatine) wurde — indem der Gehalt an Wasser und Asche jedes einzelnen Präparates berücksichtigt worden — eine Quantität abgewogen, welche in warmem Wasser gelöst eine 50 ccm. betragende Lösung mit einem Gehalt an 4% organischer Trockensubstanz ergab. Diese betreffs der Concentration demnach auf einer Stufe stehenden Lösungen wurden unter gleichartigen Verhältnissen mit dem Millon'schen Reagens geprüft. In verschiedenen Probenröhren wurden 10 ccm. jeder Lösung mit dem gleichen Volumen eines sehr verdünnten Reagens gemischt und dann die acht Probemischungen gleichzeitig ins Wasserbad hereingesenkt. Innerhalb des Bruchtheils einer Minute erschien in sämtlichen Proben eine bestimmt wahrnehmbare Rothfärbung, die während der nachfolgenden Minuten etwas gesteigert wurde. Sowohl als die Probemischungen nach 5 Minuten dem Wasserbade entnommen wurden, als später, nach dem Abkühlen, war die Färbung in allen Proben von derselben Stärke; weder Verf. noch zwei andere mit derartigen Beobachtungen vertraute Personen waren trotz ernststen Bemühens im Stande, eine der Proben in Bezug auf den Färbungsgrad von den anderen auszuscheiden.¹⁾

¹⁾ Auch bei der Prüfung mit der Xanthoproteinsäurereaction, die ja betreffs Proteinstoffe im Allgemeinen mit der Millon'schen parallel verläuft, ergab sich, besonders bei Uebersättigung mit Ammoniak, bei allen acht Lösungen ein durchaus deutlicher positiver Ausschlag, und zwar hier ebenfalls ohne einen bemerkbaren Unterschied bezüglich des Färbungsgrades der verschiedenen Proben.

Wenn das positive Verhalten des Glutins der Millon'schen Reaction gegenüber thatsächlich nur das Vorhandensein unvermeidlicher, accessorischer Beimischungen (Eiweissstoffe, Mucin u. A.) anzeigen sollte, hätten Glutinpräparate, welche einer in Bezug auf die Entfernung solcher Beimischungen so differentier Behandlung unterzogen waren, wie es im vorliegenden Falle geschehen, nothwendiger Weise wenigstens eine Abstufung im Reactionsresultate ergeben müssen; eine solche konnte jedoch, wie eben erwähnt worden, nicht einmal bei der Vergleichung der extremen Proben beobachtet werden: der Präparate Nr. V und VI (d. h. der am kräftigsten mit Kali behandelten) gegenüber den Präparaten Nr. VII und VIII (der nur mit Wasser extrahirten, bezw. der ursprünglichen Gelatine).¹⁾

Der zuerst von van Name ausgesprochenen und auch von mir gehegten Ueberzeugung steht besonders die Angabe W. Krukenberg's (siehe oben S. 484, Fussnote) in bestimmtem Widerspruch gegenüber. Da ich indes beobachtet habe, dass je nach der Art und Weise, wie mit der Millon'schen Reaction verfahren wird, dasselbe Glutinmaterial das eine Mal eine deutliche und bleibende, ein anderes Mal aber nur eine rasch vorübergehende Färbung darweist, dass mit anderen Worten bei ungeeigneter Anordnung ein positiver Ausfall sich der Beachtung entziehen kann, so wage ich in diesem Umstande eine Erklärung der Entstehung jener von keinem Anderen bestätigten Krukenberg'schen Angabe zu erblicken. Wenn man dem Uebersehen eines etwaigen positiven Auschlages bei der Prüfung des Glutins mit dem Millon'schen Reagens vorbeugen will, sollte man nur eine ganz geringe Menge des Reagens zusetzen oder sich eines im Voraus stark verdünnten Reagens bedienen, denn ein Ueberschuss bewirkt, dass die Färbung — auch wenn sie wenige Augenblicke zum Vorschein kommt — schnell und zwar de-

1) Dass nicht einmal die ursprüngliche Gelatine eine kräftigere Färbung lieferte, als die übrigen Präparate, wird dadurch erklärt, dass hier zufällig eine aussergewöhnlich reine Handelssorte verwendet wurde.

finitiv verschwindet.¹⁾ Die nachstehenden Versuche theilen hierüber Näheres mit.

Von aus den Präparaten Nr. I—VIII hergestellten 2%igen Glutininlösungen wurden je 10 ccm. abgemessen und diese Proben auf 2 Serien, A und B, vertheilt. Den Proben der Serie A wurden je 10 ccm. vom unverdünnten Millon'schen Reagens zugefügt, denen der Serie B die gleiche Menge eines mit 8—10 Volumina destillirten Wassers verdünnten Reagens. Die Proben wurden ins Wasserbad eingesenkt.

Serie A: Während der ersten $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Minute, d. h. ehe die Probemischung die Temperatur des siedenden Wassers angenommen hatte, erschien eine Rothfärbung, die aber fast augenblicklich verschwand und während der bis auf die Dauer von 10 Minuten fortgesetzten Erhitzung nicht wieder bemerkbar wurde, sondern von einer schwachen Gelbfärbung (= Xanthoproteinsäurereaction) ersetzt wurde.

Serie B: Nach und nach zeigte sich die Rothfärbung, die, nachdem sie binnen weniger Minuten ihr Maximum erreicht, während der weitere 10 Minuten lang dauernden Erhitzung unverändert blieb.

Die eben besprochenen Versuche geben leicht zu verstehen, dass, falls man sich des in der Serie A benutzten Reagenszusatzes bedient hätte, und wenn man — nachdem die Probengläser in ein gewöhnliches, undurchsichtiges Wasserbad gebracht worden — sie erst nach etwa einer Minute zwecks Beobachtens wieder herausgenommen hätte, jene flüchtige Färbungserscheinung nothwendiger Weise gänzlich übersehen worden wäre.

1) Die Vorschrift Salkowski's (A' S. 267): «..... zweckmässig erhitzt man zuerst die Leimlösung zum Sieden, tropft einige Tropfen [vom Verf. cursiv.] Millon's Reagens hinzu und erhitzt dann weiter», lässt Einen ganz deutlich zwischen den Zeilen lesen, dass S. die gleiche Erfahrung gemacht hat.

a) Einleitung.

Sogar in so später Zeit wie Anfangs dieses Jahrzehnts hatte das Verhältniss des Glutins zur obengenannten Reagentiencombination noch keine streitigen Auffassungen veranlasst. Allgemein war die Angabe, dass Glutin von Ferrocyankalium + Essigsäure (bezw. Salzsäure) nicht gefällt werde.¹⁾ Ja, man meinte sogar in diesem Umstande ein Unterscheidungsmittel zwischen dem Glutin und der Mehrzahl der Eiweissstoffe zu besitzen. Den ersten Stoss versetzte Hammarsten dieser damals so verbreiteten Ansicht in seinem 1891 erschienenen Lehrbuche (M S. 32) mit den Worten: «Von gelbem Blutlaugensalz kann eine mit Essigsäure angesäuerte Leimlösung bei vorsichtigem Zusatz des Reagens gefällt werden». In dem zwei Jahre später erschienenen Lehrbuche von F. Hoppe-Seyler (Q S. 271) findet man dieselbe Auffassung und neulich (1897) hat van Name (Z S. 129) sich ihr angeschlossen. Andererseits hat die ältere Auffassung sich in den verhältnissmässig neuerschiedenen Lehrbüchern Neumeister's (Ä S. 47) und Salkowski's (A' S. 266) — beide im Jahre 1893 veröffentlicht — unverändert bewahrt.

Dieser Sachlage gegenüber fragt man sich unwillkürlich: was mag der Anlass sein, dass eine scheinbar so einfache Frage so diametral verschieden beantwortet worden, und was mag vor Allem bewirkt haben, dass von den sich mit ihr beschäftigenden Forschern nur wenige, und zwar erst jüngst, mit der betreffenden Reagentiencombination positive Resultate verzeichnen haben können? Der Grund ist ganz gewiss darin zu erblicken, dass diese für das Glutin durchaus charakteristische Fällungsreaction gegen einige bei dem Ausführen zur Wirkung kommende Nebenumstände, deren jeder einzelne das Eintreten der Reaction behindern kann, äusserst

1) Lehmann, T S. 373; Gerhardt, H S. 510; Gorup-Besanez, I S. 141; Hammarsten, K S. 306; Verf., U S. 232.

(Bei Gerhardt und Gorup-Besanez ist das Ansäuern der Flüssigkeit nicht direkt angegeben.)

empfindlich ist, und dass man diesen Umständen bisher nicht die gebührende Aufmerksamkeit zugewandt hat.

Eine wichtige Fehlerquelle hat bereits Hammarsten hervorgehoben, nämlich die Löslichkeit des Niederschlags im Ferrocyankaliumüberschuss, woraus zu folgern ist, dass eine unvorsichtige Zugabe dieses Reagens das Nichteintreten des Niederschlags nach sich ziehen kann. Eine diesbezügliche Warnung bringen denn auch Hoppe-Seyler und van Námé.

Es finden sich aber, nach dem, was ich durch eingehenderes Studiren dieser Reaction ermittelt habe, noch andere verschiedene Ursachen des Misslingens der Reaction. Dieser Fehlerquellen wird in der nächsten Abtheilung Erwähnung gethan.

b) Eigene Versuche.

a) Methodik.

1. *Glutmaterial.* Verwendet wurden theils Präparat Nr. VIII mit einem Gehalt an Asche von 1,87%, theils ein daraus durch energisches Auswaschen mit verdünnter Essigsäure und destillirtem Wasser dargestelltes Präparat (Nr. IX. mit einem Aschengehalt von 0,22%.

Die Stärke der benutzten Glutinlösungen wurde mit Bezugnahme auf den Gehalt der Präparate an Feuchtigkeit und Asche berechnet, und die nachstehenden Glutinwerthe beziehen sich also auf aschefreie Trockensubstanz. Bei den Hauptversuchen kamen Concentrationen von 1, 2, 4 bzw. 8% zur Verwendung.¹⁾

2. *Reagenslösungen.* Verwendet wurden 10%ige Wasserlösungen von krystallisirtem Ferrocyankalium, Essigsäure und Chlornatrium.

¹⁾ Mit dem Procentgehalt einer Lösung ist überall in dieser Abhandlung die Gesamtzahl der betreffenden Substanz in 100 ccm., nicht in 100 g der Lösung gemeint. Dieses Bezeichnungsverfahren ist zwar theoretisch nicht ganz correct, veranlasst jedoch keinerlei Irrthum, wenn es consequent angewandt wird, und bei Arbeiten der vorliegenden Kategorie ist es mit erheblichem praktischen Vortheil verknüpft.

3. *Allgemeine Anordnung.* In Probenröhren wurden je 10 ccm. der fraglichen, kurz zuvor dargestellten und bis auf Zimmertemperatur abgekühlten Glutininlösung gegossen. Ohne Verzug wurde in einen kleinen Messcylinder die berechnete Menge Essigsäure gegeben — in gewissen Versuchen ausserdem die berechnete Menge Chlornatriumlösung — nebst soviel destillirtem Wasser, dass die ganze Mischung (aus Essigsäure, destillirtem Wasser, eventuell Chlornatriumlösung) 10 ccm. minus die berechnete Menge der Ferrocyankaliumlösung ausmachte. Diese Mischung wurde in die Glutininlösung gegossen und mit ihr gemischt, worauf die berechnete Menge der Ferrocyankaliumlösung aus einer feingraduirten Pipette zugesetzt wurde. Das gesammte Volumen der Reactionsmischung belief sich demnach für jede Probe auf genau 20 ccm.¹⁾

Nach sofortiger Vermischung des Proberohrinhalts begann die Beobachtung, die — falls der Niederschlag nicht schon früher zum Vorschein kam — $\frac{1}{2}$ Minute lang fortgesetzt wurde. Als positives Ergebniss wurde jede Probe verzeichnet, in der ein deutlicher, flockiger Niederschlag während der erwähnten Zeit beobachtet wurde; als negative die übrigen, in denen nach jener Periode die Flüssigkeit entweder klar blieb oder nur eine Opalescenz oder — in einzelnen Fällen — eine unbestimmte, nicht flockige Trübung darwies. In den Versuchsprotokollen bezeichnet «+ 15° C.» die jedesmalige Zimmertemperatur, in diesem Falle + 15° C. oder ein wenig höher, bis höchstens + 18° C. Bei den mit bestimmter Temperatursteigerung bis + 30° C. angestellten Versuchen wurden sowohl die Glutininlösung, die Reagenzlösungen und das zu verwendende destillirte Wasser, als auch die Mess- und Beobachtungsgefässe in ein Wasserbad von der betreffenden Gradzahl versenkt.

Der Uebersichtlichkeit halber werden nachstehend nicht die bei den Versuchen direkt verwendeten Reagenzlösungs-

1) Der Glutiningehalt in der Reactionsmischung war demnach genau halb so gross wie derjenige der betreffenden Glutininlösung.

mengen sondern die mit ihrer Hülfe berechneten Procentzahlen der fraglichen Substanz (krystallisirtes Ferrocyankalium, Essigsäure u. s. w.) in der Reactionsmischung angegeben, welches Berechnungsverfahren auch in Bezug auf das Glutin selbst (und dessen Aschenbestandtheile) angewandt wird.

In jeder besonderen Versuchsgruppe (insgesammt 48 St.) wurde verwendet:

Von Ferrocyankalium («Fck») 0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5 bez. 1,0^o/o;

Von Essigsäure («Ä») 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 bezw. 4,0^o/o.¹⁾

In jeder Versuchsserie (insgesammt 12 St.; je 4 Gruppen umfassend) wurde verwendet:

Von Glutin 0,5; 1,0; 2,0 bezw. 4,0^o/o.²⁾

Die Protokolle verzeichnen nur diejenigen Reagenscombinationen, welche positive Ergebnisse lieferten; mit Hülfe der obigen, in jeder Versuchsgruppe geprüften Reagensmengen ist indes die Vervollständigung der negativ ausfallenden Reagenscombinationen leicht zu bewerkstelligen, auch wenn sie z. Th. der Raumersparniss halber nicht direkt angeführt worden.

1) Wenn in den Protokollen ein Bindestrich zwei die Essigsäuremenge angegebende Ziffern verbindet, z. B. 0,25—4,0, sind die dazwischen liegenden Mengen einbegriffen. Also in dem angeführten Exempel: 0,5; 1,0 und 2,0.

2) Da die Zifferangaben der Versuchsprotokolle sammt und sonders % bezeichnen, wird auf das jedesmalige Hinzufügen des %-Zeichens verzichtet.

Die den Glutinemengen 0,5; 1,0; 2,0 und 4,0 entsprechenden Versuchsgruppen jeder Serie werden in den Protokollen als Gruppe 1, 2, 3 bezw. 4 aufgeführt, sodass die Glutinconcentration einer «Gruppe 1» immer 0,5, einer «Gruppe 3» immer 2,0 u. s. w. war.

ß) **Protokolle.**

I. Glutinpräparat Nr. VIII.

A. Ohne Zusatz von NaCl.

a) Versuchstemperatur + 15° C.

Gruppe 1. Glutin: 0,5. Aschebestandtheile: approx. 0,01. Ser. 1.

Fck	\bar{A}	Anzahl + ¹⁾
0,06	0,06 —0,5	17
0,125	0,125—2,0	
0,25	0,25 —4,0	
0,5	1,0 —4,0	

Gruppe 2. Glutin: 1,0. Aschebestandtheile: approx. 0,02.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125	0,5	4
0,25	0,5—2,0	

Gruppe 3. Glutin: 2,0. Aschebestandtheile: approx. 0,04.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

Gruppe 4. Glutin: 4,0. Aschebestandtheile: approx. 0,08.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

b) Versuchstemperatur + 30° C.

Gruppe 1.

Ser. 2.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125	1,0	3
0,25	0,5—1,0	

¹⁾ = Anzahl der Reagenscombinationen, welche positives Resultat ergaben.

Gruppe 2—4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

B. Mit Zusatz von NaCl.

a) Versuchstemperatur + 15° C.

α) NaCl : 0,06.

Gruppe 1.

Ser. 3.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125 0,25	0,25—0,5 0,5	3

Gruppe 2—4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

β) NaCl : 0,125.

Gruppe 1—4.

Ser. 4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

b) Versuchstemperatur + 30° C.

α) NaCl : 0,06.

Gruppe 1.

Ser. 5.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125 0,25	1,0 0,5—1,0	3

Gruppe 2—4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

β) NaCl : 0,125.

Gruppe 1—4.

Ser. 6.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

II. Glutinpräparat Nr. IX.

A. Ohne Zusatz von NaCl.

a) Versuchstemperatur + 15° C.

Gruppe 1. Glutin: 0,5. Aschebestandtheile: approx. 0,001. Ser. 7.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,03	0,06 —0,25	21
0,06	0,06 —1,0	
0,125	0,125—2,0	
0,25	0,25 —4,0	
0,5	1,0 —4,0	

Gruppe 2. Glutin: 1,0. Aschebestandtheile: approx. 0,002.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,06	0,25	12
0,125	0,25—2,0	
0,25	0,5 —4,0	
0,5	1,0 —4,0	

Gruppe 3. Glutin: 2,0. Aschebestandtheile: approx. 0,004.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,25	1,0	1

Gruppe 4. Glutin: 4,0. Aschebestandtheile: approx. 0,008.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

b) Versuchstemperatur + 30° C.

Gruppe 1.

Ser. 8.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,06	0,125—0,5	9
0,125	0,25 —1,0	
0,25	0,5 —2,0	

Gruppe 2.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125	0,25—1,0	6
0,25	0,5 —2,0	

Gruppe 3—4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

B. Mit Zusatz von NaCl.

a) Versuchstemperatur + 15° C.

α) NaCl : 0,06.

Gruppe 1.

Ser. 9.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,125	0,25—1,0	7
0,25	0,25—2,0	

Gruppe 2.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,25	1,0—2,0	2

Gruppe 3—4.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

Gruppe 1—4. $\beta)$ NaCl : 0,125. Ser. 10.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

b) Versuchstemperatur + 30° C.

Gruppe 1—4. $\alpha)$ NaCl : 0,06. Ser. 11.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

Gruppe 1—4. $\beta)$ NaCl : 0,125. Ser. 12.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
—	—	0

r) Aus den Protokollen (nebst einigen Extraversuchen) gefolgerte Schlüsse, betreffs der Einwirkung nachstehender Factoren.

1. Die Mengenverhältnisse des Fck, bezw. der \bar{A} .

Ein gewisses Minimum sowohl des Fck als der \bar{A} war in jedem einzelnen Falle von nöthen. Kein positives Resultat wurde mit 0,015 Fck erlangt und nur in einem Falle (Ser. 7, Gr. 1) mit 0,03; gewöhnlich betrug das Minimum 0,06 oder 0,125, wurde aber in 2 Fällen (Ser. 7, Gr. 3; Ser. 9, Gr. 2) bis auf 0,25 gebracht.¹⁾ Von der \bar{A} erwies die Menge 0,03 sich in sämmtlichen Fällen als ungenügend; in 2 Fällen (Ser. 1, Gr. 1; Ser. 7, Gr. 1) waren 0,06, in einem Falle (Ser. 8, Gr. 1) 0,125 hinreichend, während das Minimum in den übrigen Fällen zwischen 0,25 und 1,0 variirte.

Andererseits war ein Maximum nachweisbar, dessen Ueberschreiten das Nichteintreten der Reaction — wegen der

¹⁾ Dieser Werth repräsentirte in beiden Fällen auch das Maximum.

Löslichkeit des Niederschlages im Reagensüberschusse — befürchten liess. Betreffs Fck lag dieses Maximum, nach dem was Hammarsten u. A. betont (siehe S. 490), ausserordentlich niedrig. In allen Fällen erwies das Maximum sich als überschritten bei 1,0, und sämtliche beobachtete Maximalwerthe lagen innerhalb der engen Grenzen 0,25—0,5. Dem entgegen ergaben die Maximalzahlen der \bar{A} -Werthe ein Schwanken innerhalb weiter Grenzen, von 0,25 (Ser. 7, Gr. 1—2) bis 4,0.¹⁾

Was das gegenseitige Verhältniss der beiden Reagentien zu einander betrifft, so erheischt eine grössere Zugabe von Fck eine entsprechende Vermehrung von \bar{A} . Um ein Beispiel aus der Mitte herauszugreifen: während (in der Ser. 7, Gr. 1) 0,06 Fck schon mit 0,06 \bar{A} den Niederschlag erzeugt, erheischt 0,5 Fck mindestens 1,0 \bar{A} . Als eine Reagenscombination von allgemeinerer Gültigkeit ergab sich: 0,25 Fck mit 0,5—1,0 \bar{A} , welche in allen jenen Fällen, wo überhaupt ein positives Resultat erlangt wurde, einen Niederschlag erzeugte.

2. Die Concentration der Glutininlösung.

Hinsichtlich dieses Factors bringt das Studium der Versuchsprotokolle ganz unerwartete Ergebnisse an den Tag. Es erhellt aus ihnen, dass die Reaction bei Verwendung einer concentrirten Glutininlösung viel eher dem Misslingen ausgesetzt ist, als bei dem Gebrauch einer verdünnten. Von der Glutininmenge 0,5 ausgehend, finden wir, dass die Zahl der positiv ausfallenden Reagenscombinationen für jeden höheren Concentrationsgrad rasch abnimmt, z. B. in der Ser. 7, Gr. 1—4 von 21 bis auf 12, 1, bezw. 0 sinkt. Durchgehends war mit gar keiner Combination der betreffenden Reagentien überhaupt noch ein Niederschlag zu erlangen, falls ein gewisses, keines-

¹⁾ Oder, richtiger, in vielen Fällen einen noch höheren Werth (als 4,0), obgleich der thatsächliche \bar{A} -Maximalwerth bei dem Festhalten an konsequenter Durchführung des Untersuchungsplanes nicht mit Gewissheit ermittelt werden konnte, weil das Volumen der Reactionsmischung bei reichlicherer \bar{A} -Zugabe über 20 ccm. (siehe S. 491) hinausgegangen wäre und also keine direkte Vergleichung der Proben weiter hätte geschehen können.

wegs sehr hohes Glutinmaximum (1,0 bei dem Präparat Nr. VIII, 2,0 bei dem Präparat Nr. IX) überschritten worden war.

Bei dem stark aschehaltigen Präparate Nr. VIII ist diese Erscheinung offenbar zum Theil auf das Vorhandensein der verunreinigenden Salze zurückzuführen, dass sie aber nicht ausschliesslich darauf beruht, sondern grösstentheils von der zu starken Glutinhäufung in den Reagensmischungen abhängt, erhellt aus den Parallelversuchen mit dem an Asche armen Präparat Nr. IX, welches der Hauptsache nach dieselbe Eigenthümlichkeit aufweist.

Andererseits kann die Glutinmenge erheblich (unter den Werth 0,5) herabgebracht werden, ohne dass deswegen das positive Resultat ausbliebe. Bei einer Extra-Versuchsgruppe war das Optimum der Glutinconcentration sogar niedriger als jener Werth.

Vers. Glutin (Präparat Nr. VIII): 0,25. Aschebestandtheile: approx. 0,005. Versuchstemperatur + 15° C.

Fck	\bar{A}	Anzahl +
0,03	0,06—0,125	21
0,06	0,06—1,0	
0,125	0,06—2,0	
0,25	0,25—4,0	
0,5	1,0 —4,0	

Hier wurde demnach eine höhere Zahl (21 gegenüber 17) von Fällung erzeugenden Reagenscombinationen erzielt, als bei der entsprechenden Versuchsgruppe mit der Glutinconcentration 0,5 (Ser. 1, Gr. 1).

Diese Fällungsreaction besitzt einen beträchtlichen Grad von Empfindlichkeit. Wenn die Beobachtungszeit über die in den vorhin angeführten Versuchen beobachtete Dauer von $\frac{1}{2}$ Minute hinausging, ergab jegliche Glutinmenge bis auf 0,015 hinab bei der Prüfung beider Glutinpräparate positiven Aus-
schlag.

Vers. Fck: 0,25, \bar{A} : 1,0. Versuchstemperatur + 15° C.

Glutin	Fällungsergebnis
0,25	} Sofort flockiger Niederschlag.
0,125	
0,06	} Sofort Trübung; innerhalb 1/2 a. bzw. 3 Minuten flockiger Niederschlag.
0,03	
0,015	Allmählich eintretende Trübung, die nach 10 Minuten in einen äusserst feinflockigen Niederschlag überging.

Aus dem Dargelegten erhellt ganz deutlich, dass es bei dem Ausführen dieser Fällungsreaction zweckwidrig wäre, um «sicher zu gehen», eine besonders starke Glutininlösung zu benutzen, im Gegentheil, mit einer schwächeren Lösung wird man des Gelingens sicherer sein.

3. Gegenwart von Neutralsalzen.

Eine Durchsicht der Versuchsprotokolle lässt den Einfluss gewahren, den NaCl, sogar in recht unbedeutender Menge, auf das Ergebniss der Reaction ausübt. Schon die geringe Menge von 0,06 NaCl bewirkte eine deutliche Abnahme der Anzahl + [man vergleiche z. B. die Ser. 7, Gr. 2 (12 +) mit der Ser. 9, Gr. 2 (2 +) oder die Ser. 8, Gr. 1 (9 +) mit der Ser. 11, Gr. 1 (0 +)], und die Quantität 0,125 verhinderte in jedem Falle das Eintreten der Reaction.

Nachdem die quantitative Prüfung mit mehreren anderen Salzen¹⁾ ergeben, dass diese ausnahmslos die Fähigkeit besitzen, das Entstehen des Niederschlags zu erschweren, resp. zu verhindern, war somit die Erklärung zweier Verhältnisse — der Empfindlichkeit der Reaction gegenüber überschüssigem Fck und des unverkennbaren Einflusses des Gehaltes an Glutinasche — gefunden.

Um mehr direkt nachzuweisen, dass überschüssiges Fck die Entstehung des Niederschlags verhindert, und zwar nicht in

¹⁾ Ausser dem Kochsalz kamen noch Chloride von Kalium, Ammonium. Magnesium, Calcium und Baryum, Sulfate von Natrium und Ammonium. Nitrate von Natrium und Ammonium, Phosphat von Natrium und Acetate von Natrium und Baryum zur Verwendung.

Folge des Ferrocyanwasserstoffgehaltes dieser Verbindung, sondern eben in Folge seiner Eigenschaft als Neutralsalz — wodurch das Fck nur als ein vereinzelttes Exempel der allgemeinen Regel dargelegt werden würde — wurden einige Versuche mit freier Ferrocyanwasserstoffsäure¹⁾ als Ersatz des Kaliumsalzes ausgeführt, bei denen die Zugabe von \bar{A} überflüssig war. Im Uebrigen wurden die Versuche nach dem oben (S. 490—492) angegebenen Plane ausgeführt.

Vers. Glutin (Präp. Nr. IX): 0,5; 1,0, bzw. 2,0. Ferrocyanwasserstoffsäure: entsprechend 0,5; 1,0; 2,0, bzw. 4,0 Fck. Versuchstemperatur + 15°C. Sämmtliche Proben lieferten positive Ergebnisse.

Wenn wir uns des Ergebnisses bei den entsprechenden Versuchen mit Kaliumsalz (Ser. 7, Gr. 1—3) erinnern, bei denen das Maximum des Fck durchgehends niedriger als 1,0 war, kann in Bezug hierauf kein Zweifel mehr obwalten.

In manchen Fällen wird es vorgekommen sein, dass der berührte Factor — Vorhandensein von Neutralsalz — auf den Verlauf der Reaction, und demzufolge auch auf die Auffassung des Untersuchers hinsichtlich der Fällbarkeit des Glutins mit der Reagenszusammenstellung $\text{Fck} + \bar{A}$, störend eingewirkt hat. Es seien ein paar leicht denkbare Fälle zu nennen: *a)* mit einem an sich mehr als gewöhnlich aschehaltigen Glutin; *b)* mit einem nach dem Ausfällen mit Ammoniumsulfat einfach ausgepressten (d. h. nicht durch Dialyse oder dergl. vom Salz befreiten) Glutin; *c)* mit einer ursprünglich sauren²⁾ Glutin-

1) Nach der Vorschrift im Handbuch Schmidt's (E' S. 553) hergestellt und dann gereinigt durch wiederholtes Lösen in Wasser und Ausfällung durch Abkühlung unter Aetherzusatz. Die krystallisirte Säure, welche bei qualitativer Prüfung keinen Ausschlag für Kalium oder Chlor lieferte, wurde in Wasser gelöst. Die beim Titriren 6,1% Ferrocyanwasserstoffsäure — etwa 12% kryst. Fck entsprechend — enthaltende Lösung wurde verdünnt, bis sie einer 10%igen Fck-Lösung entsprach, so dass sie in Bezug auf die Ferrocyanwasserstoffsäure mit der bei den übrigen Versuchen verwendeten Fck-Lösung gleichwerthig war.

2) Ein Salzsäuregehalt von nur 0,15—0,2% würde bei der Neutralisirung mit Natronlauge eine für das Verhindern der Reaction hinreichende Menge NaCl ergeben.

lösung, die vor dem Reaktionsversuche neutralisirt wurde — mit jedem derartigen Versuchsmateriale würde die Reaction entschieden misslungen sein.

4. Gegenwart gewisser organischer Stoffe.

Einige freilich weniger direkt interessirende Versuche, durch welche ermittelt werden sollte, ob gewisse bei physiologisch-chemischen Arbeiten allgemein vorkommende organische Stoffe die fragliche Fällungsreaction beeinflussen, seien hier mitgetheilt.

Vers. Glutin (Präparat Nr. IX): 0,5. Fek: 0,25. \bar{A} : 1,0. Versuchstemperatur $+ 15^{\circ}$ C. Die Versuchssubstanz wurde in der Glutinlösung aufgelöst; im Uebrigen die gewöhnliche Versuchsanordnung.

Versuchssubstanz	Fällungsergebniss
Aethylalkohol	In Mengen bis 5,0 ohne sichtbaren Einfluss.
Aethyläther	
Glycerin	
Mannit	
Traubenzucker	
Rohrzucker	In Mengen von 0,25 ohne deutlichen Einfluss. aber bereits bei 1,5 das positive Resultat gänzlich verhindernd.
Harnstoff	
Kreatin	
Glycocoll	
Asparaginsäure	

5. Versuchstemperatur.

Dieser Factor ist unleugbar von grossem Einfluss, und zwar insofern, als die Steigerung das Eintreten des Niederschlags behindert. Es seien z. B. verglichen die bei 15° C. ausgeführten Versuche der Ser. 1, Gr. 1—2 mit denen bei $+ 30^{\circ}$ C. der Ser. 2, Gr. 1—2, welche den ersteren sonst in Allem gleich kommen. Bei jenen finden wir 17, bzw. 4 Reagenscombinationen, welche positive Resultate ergeben, bei diesen nur 3, bzw. 0.

Nach meinem Dafürhalten ist eben diese Einwirkung der Temperatur eine Fehlerquelle gewesen, welche — vielleicht nebst einer oder mehreren der hier angeführten — eine Anzahl der negativen Angaben in Bezug auf die Fällbarkeit des Glutins für $\text{Fck} + \bar{\text{A}}$ veranlasst haben mag, denn da das Glutin behufs des Lösens unbedingt Erwärmen fordert, wird leicht eingesehen, dass der Untersucher bisweilen mit einer Lösung von $+ 30^\circ \text{C.}$ oder einer noch wärmeren gearbeitet haben mag, da kein Grund vorlag, dem Abkühlen der Glutininlösung vor dem Ausführen der Reaction irgendwelche besondere Aufmerksamkeit zuzuwenden.¹⁾

6. Vorkommen des Glutins in nicht-gelatinirender Form.

Zufällig wurde die Beobachtung gemacht, dass eine 0,5%ige Glutininlösung (Präparat Nr. VIII), die mehr als eine Woche lang in Zimmertemperatur aufbewahrt worden und während der Zeit einen Fäulniss verrathenden Geruch angenommen hatte, mit $\text{Fck} + \bar{\text{A}}$ keinen Niederschlag mehr gab. Nachdem die Lösung über dem Wasserbade auf den berechneten Glutiningehalt von 4% concentrirt worden war, ohne darnach während 24-stündigen Stillstehens an kühlem Ort Anzeichen von Gelatinirung zu zeigen, wurden verdünnte Lösungen von 2,0; 1,0; 0,5; 0,25, bezw. 0,125% hergestellt und mit $\text{Fck} + \bar{\text{A}}$ in wechselnden Mengen geprüft — Alles aber mit negativem Resultat. Muthmassend, dass das Ausbleiben der Reaction möglicher Weise vom Vorhandensein löslicher Fäulnissprodukte abhängen könnte, fällte ich den Rest der 4%igen Lösung mit Alkohol, sammelte den zähen Niederschlag sofort auf und prüfte ihn in verschiedenen stark verdünnten Wasserlösungen. Auch hierdurch war kein Niederschlag zu gewinnen.

1) Siehe die Vorschrift in dem Lehrbuche Salkowski's (A' S. 266): «Die so erhaltene ungefähr 2%ige Lösung dient, nachdem sie sich etwas [vom Verf. cursiv.] abgekühlt hat, zu folgenden Reactionen . . . ».

«Zusatz von Essigsäure + Ferrocyankalium: kein Niederschlag».

Hierbei sei daran erinnert, dass eine Lösung von z. B. $+ 30$ bis 35°C. nach gewöhnlicher Auffassung nicht als «warm» imponirt.

Um dieses Versuchsergebnis zu kontrollieren, wurde eine 4%ige Lösung des Präparats Nr. IX in dem Autoclaven einige Stunden lang bis auf $+ 150^{\circ}$ C. erhitzt. Die dann nicht gelatinisierende Lösung ergab bei der Prüfung in wechselnder Verdünnung das gleiche, nämlich ein negatives Resultat. Eine weitere Bestätigung, dass das Nichteintreten der Reaction keineswegs der zufälligen Existenz ungünstig beeinflussender Stoffe zuzuschreiben war, wurde durch fernere Versuche mit der bis 0,5% verdünnten, nicht gelatinisierenden Lösung erzielt. Die Versuche vertheilten sich auf 2 Parallelserien. In der ersten (Ser. A) wurde jede Probe wie gewöhnlich mit destillirtem Wasser bis auf das Volumen von 20 ccm. verdünnt, in der zweiten (Ser. B) wurde zur Erreichung desselben Volumens eine 0,5%ige Lösung unveränderten gelatinisierenden Glutins (Präparat Nr. IX) verwendet.

Vers. Fck: 0,125—0,25. \bar{A} 0,5—1,0. Versuchstemperatur $+ 15^{\circ}$ C.

Ser. A. Durchgängig negatives Resultat.

Ser. B. Niederschlag in allen Proben.

Der Versuch ergab, dass ausserhalb des Glutins liegende Hindernisse, welche etwa die Verantwortung für die negativen Fällungsergebnisse hätten tragen können, nicht existirten.

Allen Anzeichen nach gilt also die Fck $+ \bar{A}$ -Reaction nur für das echte gelatinisierende Glutin, nicht für die nicht-gelatinisierende Form (β -Glutin) oder die weiteren Umwandlungsprodukte (Gelatose, Glutinpepton u. dergl.).

5. Gelatinirung.

Die Fähigkeit, zu gelatiniren, diese Cardinaleigenschaft des echten Glutins, wird hier aus zwei speciellen Gesichtspunkten besprochen, und zwar anlässlich einiger meines Wissens bisher nicht durch Nachuntersuchung kontrollirter Litteraturangaben, deren eine die Frage vom Zusammenhange zwischen dem Aschegehalt und der Gelatinirungsfähigkeit berührt, die andere eine Erscheinung behandelt, die von den

betreffenden Verfassern mit dem Namen «die Salzdigestion des Glutins» bezeichnet wird.

**1. Nimmt die Gelatinierungsfähigkeit mit der Verminderung
des Aschegehaltes ab?**

Diese zuerst von Nasse (Å S. 32) aufgeworfene Frage wurde von ihm bestimmt bejaht.¹⁾ Die Ansicht dieses Forschers ist ferner in einigen neueren Lehrbüchern (F. Hoppe-Seyler, Q S. 270; Hammarsten, N S. 47) erwähnt und neulich ohne Rückhalt von van Name (Z S. 127)²⁾ acceptirt worden.

Schon in einem 1897 veröffentlichten Aufsätze über die organische Substanz der Fischschuppen (W S. 134) hatte Verf. Anlass, die Richtigkeit der Nasse'schen Auffassung anzuzweifeln, weil Versuche mit sehr aschearmen, aus Fischschuppen dargestellten Glutinpräparaten sie nicht bestätigten. Diese Präparate (es waren ihrer 11, und zwar mit einem Aschegehalt von durchschnittlich 0,14 %) gaben nämlich bei einer Concentration, die sich zwischen 1 und 2 % bewegte, feste Gallerte. Meine späteren Erfahrungen verfolgen dann auch eine Richtung, mit der die von Nasse ausgesprochene Meinung sich nicht gut vereinbaren lässt.

Von 5 Glutinpräparaten,³⁾ die sich durch niedrigen Aschengehalt auszeichneten — resp. 0,13; 0,13; 0,16; 0,17 und 0,22 % —, gelatinirten sämmtliche bei einer Concentration von 1 %, ja sie zeigten schon bei 0,5 % deutlich die beginnende Erstarrung. In dieselbe Versuchsserie (Glutinlösungen genau 1 %ig) wurden 7 andere Präparate mit höherem, innerhalb

1) Nasse gibt (sich auf die Versuche Krüger's stützend) sogar der Hypothese Raum, dass aschefreies Glutin der Fähigkeit zu gelatiniren gänzlich ermangeln solle.

2) van Name bedient sich nämlich der Nasse'schen Auffassung, um den Umstand zu deuten, dass eine seiner Glutinlösungen (2 %ig; Gehalt des Glutins an Asche etwa 0,3 %) ein verhältnissmässig schwaches Gelatinierungsvermögen («... some what weak power of gelatination») darwies.

3) Vermittelst eines sorgfältigen Reinigungsverfahrens aus der in der Fussnote 2, S. 477, erwähnten Gelatine dargestellt.

weiter Grenzen (0,40—3,12 ‰)¹⁾ wechselndem Aschengehalt aufgenommen. Jede Lösung erstarrte bei Zimmertemperatur zu fester Gallerte binnen weniger Stunden, wobei nicht einmal die geringen Zeitunterschiede betreffs der Dauer bis zum Eintreten der Erstarrung der verschiedenen Lösungen darauf hingenwiesen, dass die aschereicheren Präparate die weniger aschehaltigen bezüglich der Gelatinisirungsfähigkeit übertrafen.

Meine Ermittlungen stehen in schroffem Gegensatz zu der Folgerung, welcher Nasse (loc. cit.), wie es scheint, nur einen einzigen Versuch zu Grunde gelegt hatte; er beschreibt diesen u. A. mit folgenden Worten: «Der Aschengehalt des Glutins ist noch von Bedeutung für einige andere Eigenschaften des Glutins. Es nimmt erstens mit Abnahme des Aschengehaltes auch das Gelatinisierungsvermögen der Glutininlösungen ab. So war bei 17° noch gerade deutlich Gelatiniren zu erkennen bei

Glutiningehalt der Lösung	Aschengehalt des Glutins
1,7 ‰	3,1 ‰
2,9 ‰	1,5 ‰
3,7 ‰	0,6 ‰

Ob ganz aschefreies Glutin gar nicht mehr gelatinirt? Unmöglich wäre es nicht: zeigt doch auch das aschefreie Eiweiss gewissen Fällungsmitteln etc. gegenüber ein ganz anderes Verhalten, als das aschenhaltige».

Wenn die Serie in derselben Richtung weiter ausgeführt würde, sollte z. B. Glutin mit 0,3 ‰ Aschengehalt vielleicht eine 5 ‰ige Lösung erheischen u. s. w., oder — um nicht aufs Gerathewohl bestimmte Ziffern zu nennen — unter allen Umständen eine Concentration, die den zu unterst in der Serie angeführten Werth, 3,7 ‰, weitaus überträfe; es ist dieses aber eine Consequenz, die — wie zur Genüge aus dem Obigen hervorgeht — den Thatsachen nicht entspricht. Obschon es aussichtslos sein dürfte, die Entstehung der Ziffern, die Nasse seiner Hypothese unterbreitet, mit Bestimmtheit zu erklären, so erinnere ich daran, dass der Einfluss mancher

1) Aschengehalt: 0,40; 0,57; 1,45; 1,87; 1,96; 2,19 bzw. 3,12 ‰. Von diesen Präparaten waren einige Handelsgelatine im ursprünglichen Zustande, andere durch Kalibehandlung u. s. w. gereinigt.

physikalisch oder chemisch wirkender Mittel das Gelatinirungsvermögen des Glutins leicht modificirt, weshalb meines Erachtens die Nasse'schen Ziffern diesem oder jenem nicht mit in Erwägung gezogenen Nebenumstand ihre Entstehung verdanken dürften, mit anderen Worten, dass die in den beiden Reihen der Versuchsserie zur Schau kommende relative Regelmässigkeit zufällig und nicht als Causalzusammenhang zn deuten ist.

In einem ganz anderen als dem von Nasse berücksichtigten Sinne existirt allerdings ein Zusammenhang zwischen jenen beiden Factoren — der Gelatinirungsfähigkeit und der Gegenwart mineralischer Stoffe —, was zum Vorschein kommt, wenn der Gehalt des Glutins an solchen durch einen Zusatz von Neutralsalz auf eine excessive Höhe gesteigert wird, eine Frage, welche unter der nächsten Rubrik näher erörtert werden wird.

2. Existirt thatsächlich eine Erscheinung, wie die unter der Bezeichnung «die Salzdigestion des Glutins» beschriebene?

a) Einleitung.

Jenem Ausdruck — «Salzdigestion des Glutins» («digestion saline de la gélatine») — begegnen wir zum ersten Male in einer von Dastre u. Floresco 1895 veröffentlichten Arbeit (E), welche damit ihre Beobachtung bezeichnen wollen, dass Neutralsalze die Fähigkeit besässen, unter gewissen Bedingungen echtes, gelatinirendes Glutin in ein nichtgelatinirendes Produkt (Gelatose) überzuführen. Der Hauptzug der Auffassung jener Forscher kann durch folgende Sätze ausgedrückt werden.

a) Einfaches Beimischen des Neutralsalzes zu einer Glutininlösung verändert deren Gelatinirungsfähigkeit nicht.¹⁾

b) Erst wenn die Mischung 24—28 Stunden lang der Digestionstemperatur (+ 40° C.) ausgesetzt wird, tritt

1) «Les solutions salines (sel 1—10 %, gélatine 15 %) se gélifient à la température ordinaire et y restent indéfiniment à l'état de gelée. La présence du sel introduit à température basse ne les modifie pas, elles continuent à se liquifier à chaud et se gélifient à froid.» (loc. cit. S. 706.)

die Veränderung ein, indem — wenn Chlorid des Natriums und des Ammoniums oder Jodid des Kaliums und zwar in einer Concentration von 10³% in der Reaktionsmischung vorlag — die Gelatinierungsfähigkeit völlig¹⁾ zu Grunde geht,²⁾ und zwar ohne Rücksichtnahme auf die Höhe des Glutidgehalts (1, 2,5 oder 5% der Mischung).

c) Das Ausbleiben des Gelatinirens wird dadurch bedingt, dass das Glutin in Gelatose³⁾ übergeführt worden, demnach in eine chemische Umwandlung des Glutins.

d) Diese Umwandlung des Glutins ist jener völlig analog,⁴⁾ welche unter ganz anderen Verhältnissen Statt hat, z. B. bei der Einwirkung peptischer Enzyme oder gewisser Bakterien.

Als Glutininmaterial benutzten Dastre u. Floresco bei ihren Versuchen eine durch Auswässerung gereinigte Handels-gelatine, deren Lösungen (1, 2,5 bzw. 5% Glutin in der fertigen Reaktionsmischung) einer entweder antiseptischen⁵⁾ oder aseptischen⁶⁾ Behandlung unterzogen wurden, um der Fäulnis-

1) Nur solche hinsichtlich des Endeffects vollständigen Versuche habe ich experimentell wiederholt. Deswegen übergehe ich in der Darstellung Versuche mit den vorerwähnten Salzen in schwächerer Concentration (1⁰%), ferner auch die Versuche mit Fluornatrium.

2) «Il n'en est plus de même si on porte le mélange à l'étuve à 40° et qu'on l'y abandonne pendant un temps suffisant (de 24 heures à plusieurs jours). Les liqueurs tirées de l'étuve ne se prennent plus en gelée» (loc. cit. S. 706).

«La digestion saline de la gélatine exige pour s'accomplir le contact prolongé du sel dissous avec la gélatine dissoute. On le réalise . . . en laissant séjourner le mélange de vingt-quatre à quarante-huit heures à l'étuve à 40°» (loc. cit. S. 710).

3) «Elle [la gélatine] est complètement transformée en gélatose (loc. cit. 709). «On constate, lorsque la transformation est complète que la solution présente les caractères de la *gélatose* . . . » (loc. cit. S. 706).

4) «La gélatine subit dans ce cas un changement tout-à-fait analogue à celui qu'elle éprouve de la part des ferments digestifs, dans l'acte de la digestion, et des microbes dans l'acte de la liquéfaction» (loc. cit. S. 709).

5) Zusatz von Thymol oder flüchtigem Senföl.

6) Sterilisierung in der Autoclave bei + 120° C. während einer Stunde.

bei den lange andauernden Digestionsversuchen vorzubeugen. Die allgemeine Versuchsanordnung wird von den Verfassern selbst durch ein Beispiel angegeben (loc. cit. S. 705).

«Ein gewisses Volumen (z. B. 25 ccm.) einer 2%igen Glutininlösung, die bei +40° C. flüssig gemacht worden, wird mit demselben Volumen einer ebenfalls 2%igen und auf die gleiche Temperatur gebrachten Jodkaliumlösung gemischt, wodurch sich 50 ccm. einer Flüssigkeit, die 1% Glutin und 1% Jodkalium enthält, ergibt. Die so gewonnene Mischung wird verschiedenen Einflüssen ausgesetzt, z. B. bei +40° C. während mehrerer Tage digerirt. Nach dem Herausnehmen aus dem Digestionsapparate wird die Zeit notirt, welche bis Eintreten der Erstarrung verfließt, falls sie nun überhaupt eintritt».

Da diejenigen Versuchsserien von Dastre u. Floresco (loc. cit. S. 707—708), welche mit «solutions fortes de sels neutres» (= 10 % Salz in der Reaktionsmischung) und mit einem Glutiningehalt in der Mischung von 1, 2,5 bzw. 5 % ausgeführt wurden, die wichtigste Stütze ihrer Schlussfolgerungen und zugleich den Hauptgegenstand meiner Kritik bilden, sei hier das Wesentlichste der betreffenden Versuchsprotokolle im Auszuge mitgetheilt:

Exp. III. Six ballons dont un témoin contiennent de la gélatine à 1 % . . . Ils sont laissés pendant 42 heures à l'étuve à 40°; on les retire et on les abandonne à la température du laboratoire, 12°.

Chlorure d'ammonium 10 %. Reste liquide indéfiniment.

Jodure de potassium 10 %. Reste liquide.

Chlorure de sodium 10 %. Reste liquide.

Ballon témoin

Prise en gelée après 50 m.

Volume total du mélange: 150 centimètres cubes.

Exp. IV. Gélatine 2,5 %. Séjour à l'étuve, 44 heures. Température ambiante 12° [Volume totale 150 ccm].

Ballon témoin.

Gelifié après 40 m.

KJ 10 %

Reste liquide.

NaCl 10 %

Reste liquide.

AzH₄Cl 10 %

Liquide.

Exp. V. Gélatine 5 %. Séjour à l'étuve à 40°, 45 heures.
Température ambiante 12°. Ballon 50 centimètres cubes.

Ballon témoin.

Se gélifie en 15 m.

NaCl 10 %

Reste liquide.

AzH₄Cl 10 %

Liquide.

KJ 10 %

Liquide.

b) Eigene Versuche.

a) Methodik.

1. *Glutmaterial*: Die vorerwähnten Präparate Nr. VIII und IX, nebst dem Präparat Nr. X¹⁾ (Aschengehalt 0,40 %¹⁾, die in Lösungen von 2, 5 bzw. 10 % verwendet wurden, sämtliche der Antisepsis wegen mit 0,1 % Thymol versetzt.

2. *Salzlösungen*: 20 %ige Wasserlösungen von Chlorammonium (NH₄Cl), Chlornatrium (NaCl), Chlorkalium (KCl)²⁾ und Jodkalium (KJ).

3. *Allgemeine Anordnung*: Glutin- und Salzlösungen, nebst dem für die Herstellung der Kontrollproben nöthigen destillirten Wasser wurden im Digestionsapparate (+ 40° C.) belassen, bis sie seine Temperatur erhielten. Nach dem Herausnehmen der Aufbewahrungsgefäße wurden schnell die erforderlichen Mengen entnommen: von der Glutininlösung 50 ccm., von der Salzlösung³⁾ bzw. dem destillirten Wasser (für die Kontrollproben) ebenfalls 50 ccm. Die beiden Flüssigkeiten, insgesamt 100 ccm., wurden in eine Erlenmeyer'sche Flasche gethan und sorgfältig gemischt. Nachdem sämtliche zu einer Versuchsgruppe gehörenden 5 Probenmischungen in wenigen Minuten hergestellt worden waren, begannen die Beobachtungen, welche nach je 10 Minuten wiederholt wurden und mit deren Hülfe für jede einzelne Probe die Zeit, welche bis zum

1) Hergestellt durch das Reinigen einer 3,12 % Asche enthaltenden Gelatine mit der Handelsmarke «WS» in Golddruck.

2) Dieses von Dastre u. Floresco nicht benutzten Salzes bediente ich mich ausserdem, um über die Einwirkung der Alkalichloride eine allseitigere Kenntniss zu gewinnen.

3) Die fertigen Glutinsalzmischungen enthielten demnach 10 % Salz. Alle Zahlen der Versuchsprotokolle bedeuten Procente der Mischung.

ersten Wahrnehmen der Erstarrung verfloßen, verzeichnet wurde.¹⁾

Nach dem Verlauf der ersten Beobachtungsperiode wurden die Proben in Digestionsapparate (+ 40° C.) gethan und die gleiche Gelatinirungsprobe wiederholt, nachdem die Proben nach 2 × 24 Stunden andauernder Digestion²⁾ in Zimmertemperatur gebracht worden waren. Die Temperatur

1) Um die erwünschte Gleichmässigkeit bei derartigen Versuchen zu erzielen, ist es nöthig, sich theils möglichst gleich grosser und congruenter Gefässe zu bedienen, theils consequent eine bestimmte, ein wenig mehr vorgeschrittene Endstufe ins Auge zu fassen und sich nicht mit allzu dehnbaren Angaben, wie «beginnendes Erstarren» zu begnügen.

Demzufolge bediente ich mich einer Reihe Erlenmeyer-Flaschen, die eigens mit Rücksichtnahme auf ihre Gleichförmigkeit ausgewählt wurden und je 115 ccm. fassten. Mit «Gelatinirungszeit» wird in den Protokollen die Zeit bezeichnet, welche vom Anfang des Versuches bis zu dem Punkte verfloß, wo die Versuchsflasche, unter Beobachtung grosser Vorsicht, auf den Kopf gestellt und in dieser Lage beibehalten werden konnte, ohne dass vom Inhalt etwas heraustropfte. Diese Abschlussstufe ergab sich in Bezug auf die Mischungen mit 2,5 oder 5% Glutinhalt als trefflich gewählt, bei dem Gehalt von nur 1% wurde indes kein günstiges Resultat erzielt. Das bei den verschiedenen Beobachtungen unvermeidliche, wiederholte Seitwärtsneigen des Versuchsgefässes wirkte nämlich nachtheilig auf die Cohärenz der Gallerte, indem eine dermassen «gestörte» Probe nie die Stufe des Aufdenkopfstellens ohne Inhaltverlust erreichte, während ein Gefäss, das mit demselben Inhalt ebenso lange (z. B. 2 Stunden) unbewegt dastand, eine tadellose Gallerte lieferte. Da also in Bezug auf 1%ige Glutinmischungen keine mit den übrigen vergleichbare Werthen für Gelatinirungszeit bzw. Gelatinirungsverspätung erzielt werden konnten, wurden die Versuche mit dieser Glutinconcentration nicht zum Abschluss gebracht. Die beobachtete Verminderung der Cohärenz der Gallerte bildete offenbar den Beginn jener Erscheinung, welche Kühne in seinem Lehrbuche (S. S. 356) mit den Worten berührt: «Indessen ist zu bemerken, dass das Gelatiniren äusserst verdünnter Leimlösungen durch starkes und anhaltendes Schütteln scheinbar verhindert werden kann. In diesem Falle besitzt die erkaltete Lösung dann eine syrupöse (nicht viscöse, fadenziehende) Beschaffenheit — —.»

2) Die der Serie 6 angehörnden Proben wurden nach noch einer Digestionsperiode von etwa 2 × 24 Stunden (= insgesamt etwa 4 × 24 Stunden) wiederum beobachtet (siehe Ser. 7).

des Arbeitszimmers wurde während der Beobachtungen, so weit es möglich war, innerhalb + 13 bis 15° C. gehalten.

β) **Protokolle.**

I. Glutinpräparat Nr. IX.

A. Ohne Digestion.

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 1.

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät. ¹⁾	
	0 St.	50 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2	10	1	20
NaCl	2	00	1	20
KCl	2	00	1	10
KJ	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

Gruppe 2. Glutin: 5,0.

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	1	20	0	40
NaCl	1	20	0	40
KCl	1	10	0	30
KJ	3	10	2	30

B. Mit Digestion (45 Stunden).

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 2.

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2	10	1	10
NaCl	2	10	1	10
KCl	2	10	1	10
KJ	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

¹⁾ Gelatinierungsverspätung = die Zeit, welche — ausser der bei den Kontrollproben erforderlichen — die Beendigung der Gelatinierung erheischte.

Gruppe 2. Glutin: 3,0.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe				
NH ₄ Cl	1	20	0	40
NaCl	1	20	0	40
KCl	1	10	0	30
KJ	3	00	2	20

II. Glutinpräparat Nr. X.

A. Ohne Digestion.

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 3.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe				
NH ₄ Cl	2	20	1	20
NaCl	2	20	1	20
KCl	2	10	1	10
KJ ¹⁾	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

Gruppe 2. Glutin: 5,0.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	40 Min.	— St.	50 Min.
Kontrollprobe				
NH ₄ Cl	1	30	0	50
NaCl	1	30	0	40
KCl	1	20	0	40
KJ	2	40	2	00

1) Diese Probemischung wurde doppelt hergestellt. Die eine stand bis zum folgenden Tage in Zimmertemperatur und war zur Zeit der Beobachtung, etwa 20 Stunden nach der Herstellung, gelatinirt.

34*

B. Mit Digestion (44 Stunden).

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 4.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	— St.	— Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2 „	20 „	1 „	20 „
NaCl	2 „	20 „	1 „	20 „
KCl	2 „	00 „	1 „	00 „
KJ	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

Gruppe 2. Glutin: 5,0.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	— St.	— Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	1 „	20 „	0 „	40 „
NaCl	1 „	20 „	0 „	40 „
KCl	1 „	10 „	0 „	30 „
KJ	2 „	40 „	2 „	00 „

III. Glutinpräparat Nr. VIII.

A. Ohne Digestion.

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 5.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	— St.	— Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2 „	10 „	1 „	30 „
NaCl	2 „	10 „	1 „	30 „
KCl	2 „	00 „	1 „	20 „
KJ	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	20 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	1	10	0	50
NaCl	1	10	0	50
KCl	1	00	0	40
KJ	3	10	2	50

B. Mit Digestion (47 Stunden).

Gruppe 1. Glutin: 2,5.

Ser. 6.

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2	30	1	30
NaCl	2	30	1	30
KCl	2	30	1	30
KJ ¹⁾				

Gruppe 2. Glutin: 5,0.

Kontrollprobe	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	1	20	0	40
NaCl	1	20	0	40
KCl	1	20	0	40
KJ	3	40	3	00

¹⁾ Wegen der in den Serien 1 und 3 bei den entsprechenden Proben erzielten Gelatinierungsergebnisse wurde die KJ-Probe der Serie 6, Gruppe 1 nicht in die Digestionsapparate gethan, sondern stand bis zum folgenden Tage in Zimmertemperatur. Zur Zeit der dann stattfindenden Beobachtung (etwa 20 Stunden nach Herstellung der Mischung) war die Probe erstarrt — übereinstimmend mit der in der Fussnote Seite 513 erwähnten Doppelprobe.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe	1 St.	00 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	2 „	20 „	1 „	20 „
NaCl	2 „	10 „	1 „	10 „
KCl	2 „	00 „	1 „	00 „
KJ	Mehr als 5 Stunden		Viele Stunden	

Gruppe 2. Glutin: 5,0.

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe	0 St.	40 Min.	— St.	— Min.
NH ₄ Cl	1 „	20 „	0 „	40 „
NaCl	1 „	20 „	0 „	40 „
KCl	1 „	20 „	0 „	40 „
KJ	4 „	00 „	3 „	20 „

r) Aus den Protokollen (nebst einigen Extraversuchen) gezogene Schlüsse.

Um den Vergleich zwischen den von Dastre u. Floresco angegebenen und den aus meinen Untersuchungen hervorgehenden Resultaten zu erleichtern, werden letztere — analog den entsprechenden Sätzen von Dastre u. Floresco — auf folgende 4 Punkte (a—d) vertheilt.

a) Schon das Vorhandensein¹⁾ der Neutralsalze NH₄Cl, NaCl, KCl und KJ behindert in ganz unverkennbarem Grade das Eintreten der Gelatinirung, und zwar unmittelbar nach-

¹⁾ Dieser Erscheinung ist (betriffts KCl) in der physiologisch-chemischen Litteratur meines Wissens zum ersten Male in meinem Aufsatze über das Fischschuppenglutin (W S. 129, Fussnote 3) Erwähnung geschehen. Die dort angeführte — zufällig gemachte — Beobachtung, welche sich nicht gut mit der Angabe bei Dastre u. Floresco vereinbaren liess, war der eigentliche Anlass zu den in dieser Abhandlung beschriebenen, mehr detaillirten Versuchen. — Obgleich die Abhängigkeit der Glutinelatinirung von der Gegenwart einer grösseren Menge Neutral-

hängig von der Dauer des Vorkommens beider Substanzen nebeneinander und der Aufbewahrung der Mischung in der Digestionstemperatur. Es ist dieses ein Gesetz, welches auf Grund der constant eintretenden Verspätung der Gelatinierungszeit bei den Proben, welche Salz enthalten, aus den Versuchsprotokollen (siehe die Serie 1, 3 und 5) unanfechtbar erhellt: die Alkalichlorid-Proben erheischen 2—3 Mal, die Kaliumjodid-Proben vielmal die Gelatinierungszeit der Kontrollproben. Besonders auffallend ist hierbei die weitaus kräftigere Einwirkung des Jodkaliums¹⁾ als die der drei Chloride, welche bei den Versuchen mit 1%iger Glutininlösung noch deutlicher zum Vorschein kam.

Vers. Glutin (Präp. Nr. VIII): 1,0. Beobachtung nach 24 Stunden langem Stehen der Proben.

Kontrollprobe

NH ₄ Cl	}	Feste Gallerte.
NaCl		
KCl		
KJ	{	Kein Anzeichen von Erstarrung; noch nach 3tägiger Beobachtung flüssig.

Demnach meine ich wohlbegründeten Anlass zu haben, die Angabe von Dastre u. Floresco, dass das Vorhandensein von Neutralsalz an sich die Gelatinierungsfähigkeit einer Glutininlösung nicht beeinträchtigen könne, zu bestreiten.

b) Betreffs der im vorigen Punkte hervorgehobenen (durch die Gegenwart neutraler Salze veranlassten) Herabsetzung der Gelatinationsfähigkeit wirkt die Digestion bei + 40° C. weder fördernd noch hemmend. Und wie eine solche Digestion für

salzes in der physiologisch-chemischen Litteratur unbeachtet geblieben, war diese Thatsache der Hauptsache nach indes schon früher bekannt. Im Lehrbuche Schmidt's vom Jahre 1882 (E' S. 1212) z. B. heisst es nämlich: «Durch manche Salze, wie durch Kochsalz, Salpeter, Salmiak . . . wird das Gelatiniren der Glutininlösung vermindert.» (Die einzige hierhergehörende Mittheilung, welche es mir gelungen ist, aufzufinden).

¹⁾ Dieser auffallende graduelle Unterschied zwischen den Alkalichloriden einerseits und dem Kaliumjodid andererseits ist in der Arbeit von Dastre u. Floresco mit keinem Worte erwähnt worden.

die Entstehung dieser Erscheinung keine nothwendige Vorbedingung ist, so beeinflusst sie ebenso wenig den Grad derselben. Diese Behauptung dürfte keiner weiteren Motivirung bedürfen, ein Hinweis auf die Versuchsprotokolle wird genügen. Für die Gelatinirungszeit, bezw. -verspätung wurden im Grossen und Ganzen¹⁾ dieselben Werthe erzielt, sei es dass die Proben unmittelbar, d. h. ohne vorherige Digestion, beobachtet wurden. oder dass eine zweitägige, ja sogar viertägige Digestion der Beobachtung vorausging.

Die Unhaltbarkeit der Auffassung von Dastre u. Floresco bezüglich der causalen Bedeutung der Digestion für die von ihnen beobachteten Störungserscheinungen bei der Gelatinirung des Glutins glaube ich hiermit dargethan zu haben.

Die Auffassung jener Forscher möchte aller Wahrscheinlichkeit nach daraus zu erklären sein, dass genügende Sorgfalt auf kontrollirende Versuche mit Beimischung von Salzen, aber ohne Zuziehung der Digestion nicht verwendet wurde.²⁾

c) Die bei der Gegenwart von Salzen — vor oder nach der Digestion — bemerkte Beschränkung des Gelatinirungsvermögens beruht nicht auf chemischer Veränderung des Glutins: keine Gelatose oder andere Umwandlungsprodukte werden erzeugt.

Im Gegentheil, das Glutin verbleibt intact, und das Gelatinirungsvermögen kommt nach dem Entfernen des Salzes wieder in der ursprünglichen Stärke zum Vorschein.

¹⁾ Natürlicher Weise erschienen dann und wann geringere, für das Beurtheilen der Thatsachen jedoch gänzlich unwesentliche Unregelmässigkeiten. deren Vorkommen darin eine befriedigende Erklärung findet, dass die Beobachtungen nicht continuirlich verliefen, sondern mit Intervallen von 10 Minuten; dass ferner die Temperatur im Versuchszimmer bei verschiedenen Gelegenheiten bis auf 2° sich belaufende Unterschiede aufwies.

²⁾ Zwar stösst man in ihrer Arbeit auf eine diesbezügliche categorische Erklärung (im Obigen S. 507, Fussnote 1, citirt); in ihren Versuchsprotokollen spürt man aber vergebens einem einzigen concreten Exempel nach, welches geeignet wäre, diese Behauptung zu bewahrheiten. während Kontrollversuche mit den Salze entbehrenden Glutinlösungen regelmässig aufgeführt werden.

Da aus den Versuchsprotokollen nichts zu ersichen ist, was die letztere Behauptung stütze, schreite ich zur Begründung derselben, indem ich nachstehend einige Extraversuche vorführe.

Vers. 1. Nach dem Abschluss der Gelatinirungsversuche wurden die Kontroll-, NH_4Cl -¹⁾ und KJ-Proben aus der Ser. 2 (siehe S. 512—513) eigens aufbewahrt. Nachdem sie auf $+ 40^\circ \text{C}$. erwärmt worden (und die Gallerte dadurch flüssig gemacht worden), wurden ihnen unter Umrühren 5—6 Volumina starken Alkohols zugemischt. Das ausgefällte zähe Glutinklumpchen²⁾ wurde in Alkohol geknetet und in etwas warmem Wasser gelöst. Destillirtes Wasser wurde, bis das Volumen 100 ccm. erreichte, und Thymol bis zum Gehalt von 0,05% hinzugesetzt und diese Lösungen dann auf $+ 40^\circ \text{C}$. erwärmt. Die Proben wurden gleichzeitig betreffs ihrer Gelatinirungszeit beobachtet:

a) Proben der Ser. 2, Gr. 1 (mit 2,5 Glutin).

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	1 St.	10 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe				
NH_4Cl	1	20	0	10
KJ	1	20	0	10

b) Proben der Ser. 2, Gr. 2 (mit 5,0 Glutin).

	Gelatinir.-Zeit		Gelatinir.-Verspät.	
	0 St.	50 Min.	— St.	— Min.
Kontrollprobe				
NH_4Cl	1	10	0	20
KJ	1	10	0	20

1) Von den Alkalichloridproben eignete sich die NH_4Cl -Probe für den fraglichen Versuch am besten, wegen der grösseren Löslichkeit des Ammoniums Salzes im Alkohol. Nach den Angaben Biedermann's (B. S. 85, 93, 99) besitzen NH_4Cl und KCl eine Löslichkeit in Alkohol von 12, bzw. 0,5 Theilen auf 100 Theile Alkohol, während NaCl darin unlöslich ist. KJ besitzt eine Löslichkeit, welche 14 Theilen auf 100 Theile Alkohol entspricht. (Loc. cit. S. 93).

2) Die Hauptmasse des Salzes blieb in der alkoholischen Flüssigkeit zurück.

Dieser Versuch zeigt, dass die bei der Ser. 2, wenn Salze vorhanden waren, nachgewiesene Gelatinirungs-Verspätung von 1 St. 10 Min., bezw. 0 St. 40 Min. (für die NH_4Cl -Proben) und von «vielen Stunden», bezw. 2 St. 20 Min. (für die KJ-Proben) mit dem Entfernen der Salze auf ein ganz Unbedeutendes, 10—20 Min., reducirt wurde.¹⁾

Dieses Verhältniss wird durch die folgenden 2 Versuche weiter bestätigt, und zwar bezüglich des Jodkaliums — jenes Salzes, welches von den bei den Untersuchungen verwendeten die Gelatinirung des Glutins am stärksten beeinflusste.

Vers. 2. Wurde nach dem im vorigen Versuch verwendeten Verfahren ausgeführt; die Kontroll- und KJ-Proben waren der Ser. 4 (siehe S. 514) entnommen:

a) Proben aus der Serie 4, Gruppe 1 (mit 2,5 Glutin).

	Gelatinir.-Zeit	Gelatinir.-Versp.
Kontrollprobe	1 St. 00 Min.	— St. — Min.
KJ	1 „ 00 „	0 „ 00 „

b) Proben aus der Serie 4, Gruppe 2 (mit 5,0 Glutin).

	Gelatinir.-Zeit	Gelatinir.-Versp.
Kontrollprobe	0 St. 40 Min.	— St. — Min.
KJ	0 „ 50 „	0 „ 10 „

Die vorhin in der Serie 4 beobachtete Gelatinirungs-verspätung von «vielen Stunden», bezw. 2 Stunden 00 Min. war jetzt — nach dem Entfernen des Salzes — nahezu völlig aufgehoben.

Vers. 3. Jene in dem S. 517 besprochenen Versuche erwähnte Jodkaliumprobe (mit 1,0 Glutin), welche während der 3tägigen Aufbewahrung in Zimmertemperatur

¹⁾ Hauptsächlich daraus zu erklären, dass die Salze durch nur einmalige Alkoholfällung nicht genügend vollständig entfernt wurden.

Verfahren gemäss mit Alkohol etc. behandelt. Nachdem in dieser Weise überschüssiges Jodkalium entfernt worden, zeigte die Lösung nach 2stündigem Stehen in Zimmertemperatur eine deutliche Gallertbildung.

Diese und ähnliche Versuche weisen unzweideutig darauf hin, dass die betreffende Gelatinirungsveränderung nicht in einer chemischen Umwandlung des Glutins begründet, sondern auf äussere Umstände zu beziehen ist. Damit kommt demnach die Dastre u. Floresco'sche Deutung der Erscheinung in Wegfall, nämlich dass sie auf der Umwandlung des Glutins in Gelatose beruhe, somit den definitiven Verlust des Gelatinirungsvermögens bedeute.

d) Aus den unter a—c zusammengestellten Thatsachen geht hervor, dass gar keine Berechtigung existirt, eine Analogie zwischen der Einwirkung von Neutralsalzen (mit oder ohne Digestion bei $+ 40^{\circ}$ C.) auf die Gelatinirungsverhältnisse des Glutins und derjenigen Einwirkung, welche auf peptischen Enzymen oder lebenden Mikroorganismen beruht, aufzustellen, da eine solche Analogie durch keine reellen Thatsachen gestützt wird.

Bei dem Rückblick auf die in dieser Abtheilung erörterten Verhältnisse kann ich nicht umhin jene in der Rubrikenübersicht S. 507 aufgeworfene Frage: «Existirt thatsächlich eine Erscheinung wie die unter der Bezeichnung «die Salzdigestion des Glutins» beschriebene?» entschieden zu verneinen, da «die Salzdigestion des Glutins» mit demjenigen Begriff, den die oft erwähnten Forscher Dastre und Floresco diesem Ausdruck gegeben, in das Gebiet der Phantasie zu verweisen ist.

Litteratur-Verzeichniss.

- A) Berzelius: *Lärobok i organiska kemien*. Del 6. Stockholm 1830.
- B) Biedermann: *Chemikerkalender* 1887. Berlin 1887.
- C) Chittenden u. Hart: «Elastin und Elastosen». *Zeitschr. f. Biologie*. Bd. 25, S. 368 (1889).
- D) Chittenden u. Solley: «The primary cleavage products formed in the digestion of gelatin». *Journ. of physiologie*. Bd. 12, S. 23 (1891).
- E) Dastre u. Floresco: «Digestion saline de la gélatine». *Arch. de physiologie*. Bd. 27, S. 701 (1895).
- F) Eichwald: «Ueber das Mucin, besonders der Weinberg-schnecke». *Annal. d. Chemie u. Pharmacie*. Bd. 134, S. 177 (1865).
- G) Faust: «Ueber das Glutolin, ein Albuminoid des Blutserums». *Inaugural-Dissertation*. Strassburg 1898.
- H) Gerhardt: «*Traité de chimie organique*». 4. Theil. Paris 1854.
- I) Gorup-Besanez: «*Lehrbuch der physiologischen Chemie*». 4. Aufl. Braunschweig 1878.
- J) Goudoever: «*Untersuchungen über die Zusammensetzung des Leims*». *Annal. d. Chemie u. Pharmacie*. Bd. 45, S. 62 (1843).
- K) Hammarsten: «*Lärobok i fysiologisk kemi*». Upsala 1883.
- L) Hammarsten: «*Ueber den Gehalt des Caseins an Schwefel und über die Bestimmung des Schwefels an Proteinsubstanzen*». *Zeitschr. f. physiol. Chemie*. Bd. 9, S. 273 (1885).
- M) Hammarsten: «*Lehrbuch der physiologischen Chemie*». (Nach der 2. schwedischen Aufl.). Wiesbaden 1891.
- N) Hammarsten: «*Lehrbuch der physiologischen Chemie*». 3. Aufl. Wiesbaden 1895.
- O) Hjelt und Aschan: *Lärobok i organisk kemi*. Kuopio 1893.
- P) Hofmeister, Fr.: «*Ueber die chemische Structur des Col-lagens*». *Zeitschr. f. physiol. Chemie*. Bd. 2, S. 299 (1879).
- Q) Hoppe-Seyler, F. (u. Thierfelder): «*Handbuch der phy-siologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*». 6. Aufl. Berlin 1893.
- R) Krukenberg, W.: «*Untersuchungen über den chemischen Bau der Eiweissstoffe*». *Chem. Untersuch. z. wissenschaftl. Medicin*. Bd. 2. S. 152 (1888).
- S) Kühne: «*Lehrbuch der physiologischen Chemie*». 2. Aufl. 1. Theil. Leipzig 1866.
- T) Lehmann: «*Lehrbuch der physiologischen Chemie*. 2. Aufl. 2. Theil. Leipzig 1853.

U) Mörner, C. Th.: «Chemische Studien über den Trachealknorpel». Skandinav. Arch. f. Physiologie. Bd. 1. S. 210 (1889).

V) Mörner, C. Th.: «Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges». Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 18, S. 60 (I), S. 213 (II u. III) (1894).

W) Mörner, C. Th.: «Die organische Grundsubstanz der Fische schuppen vom chemischen Gesichtspunkte aus betrachtet». Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 24, S. 125 (1897).

X) Mulder: «Ueber die Zusammensetzung einiger thierischer Substanzen». Journ. für prakt. Chemie. Bd. 16, S. 129 (1839).

Y) Mulder: «Untersuchung des Leims nach längerem Kochen». Annal. d. Chemie u. Pharmacie. Bd. 46, S. 205 (1843).

Z) van Name: «The gelatin from white fibrous connective tissue». Journ. of experimental medicine. Bd. 2, S. 117 (1897).

Ä) Nasse: «Ueber die Chemie des Glutins». Rostocker Zeit., 1889, Nr. 105. (Unveränderter Abdruck im Jahresber. ü. die Fortschritte d. Thierchemie. Bd. 19, S. 29 [1889]).

Å) Neumeister: «Lehrbuch der physiologischen Chemie». 1. Theil. Jena 1893.

Ö) Obolensky: «Ueber das Mucin aus der Submaxillardrüse». Medicin.-chemische Untersuchungen (F. Hoppe-Seyler's). Heft 4. Berlin 1871. S. 590.

A') Salkowski: «Practicum der physiologischen und pathologischen Chemie». Berlin 1893.

B') Scherer: «Chemisch-physiologische Untersuchungen». Annal. d. Chemie u. Pharmacie. Bd. 40, S. 46 (1841).

C') Scherer: «Ueber den flüssigen Schleimstoff des thierischen Körpers». Annal. d. Chemie u. Pharmacie. Bd. 57, S. 196 (1846).

D') Schlieper: «Ueber den Schwefelgehalt des Leims». Annal. d. Chemie u. Pharmacie. Bd. 58, S. 378 (1846).

E') Schmidt, E.: «Ausführl. Lehrbuch der pharmaceutischen Chemie». 2. Theil. Braunschweig 1882.

F') Schützenberger u. Bourgeois: «Recherches sur la constitution des matières collagènes». Compt. rendus. Bd. 82, S. 262 (1876).

G') Schwartz: «Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der elastischen Substanz der Aorta». Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 18, S. 487 (1894).

H') Verdeil: «Schwefelbestimmung einiger organischer Körper». Annal. d. Chemie u. Pharmacie. Bd. 58, S. 317 (1846).

I') Weiske: «Zur Chemie des Glutins». Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 7, S. 460 (1883).

Zur Kenntniss der Extractivstoffe des Muskels.

Von
M. Siegfried.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)
(Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.)

Durch die früher¹⁾ mitgetheilten Analysen des Carniferrins wurden für Stickstoff Werthe von 5,45—6,03%, im Mittel von 6 Bestimmungen 5,65%, für Phosphor 1,84—2,59%, im Mittel von 4 Bestimmungen 2,12% erhalten. Unter Berücksichtigung des Mittelwerthes für Stickstoff und des niedrigsten bzw. höchsten Werthes für Phosphor erhält man für das Verhältniss N : P 3,07—2,18. Bei weiteren Analysen von Carniferrin, das aus Muskelextracten dargestellt war, wurde in der Regel ein Verhältniss N : P 2,1 gefunden. Ein weit geringeres Verhältniss ergab sich bei Carniferrinniederschlägen, die aus den Muskeln eines neugeborenen Kalbes dargestellt waren.

Das Kalb, 59 kg schwer, war während der Geburt gestorben.

Versuch I. Es wurden 2750 g der mit der Maschine zerkleinerten Muskelmasse vom linken Oberschenkel bei 40° erst mit 6 Liter, dann mit 3 Liter Wasser extrahirt und jedesmal ausgepresst. Die vereinigten Extracte wurden bei deutlich saurer Reaction aufgekocht. Das opalisirende Filtrat wurde mit Kochsalz halb gesättigt und nach Zusatz von Essigsäure wieder zum Sieden erhitzt. Die klar filtrirte Lösung wurde durch Chlorbaryum und Ammoniak von den Phosphaten befreit.

1) Diese Zeitschrift Bd. XXI, S. 363.

Das Verhältniss N : P ist etwa 1, also wesentlich geringer, als bei andern Muskelextracten gefunden wurde. Auch im Stierfleisch ist das Verhältniss dasselbe (vgl. dieses Heft S. 532), während eine grössere Anzahl von Bestimmungen in Muskeln von Hunden (vgl. dieses Heft S. 552) wieder höhere Werthe gegeben haben. Jedenfalls schwankt die Zusammensetzung der Nucleonniederschläge bedeutend mehr, als früher anzunehmen war. Entweder gibt es Nucleone von verschiedener Zusammensetzung, ebenso wie Nucleine und Protagone in ihrer Zusammensetzung sehr verschieden sind. Es können auch Nucleone von ursprünglich gleicher Zusammensetzung im lebenden Thiermuskel verändert werden, indem einzelne Gruppen abgespalten werden, ohne dass der Charakter der Verbindung aufgehoben wird. Oder es enthalten die Nucleonniederschläge nicht nur eine Substanz des Muskels, sondern mehrere, die sich vielleicht bei der Bildung des Carniferrinniederschlags in der Hitze verbinden.¹⁾ Für diese Möglichkeit spricht der Umstand (vgl. dieses Heft, S. 532), dass nach Sättigen der phosphatfreien Muskelextractlösung mit Ammoniumsulfat bei Wasserbadtemperatur aus dem Filtrate Eisenfällungen erhalten werden, welche sogar etwas mehr Phosphor als Stickstoff enthalten. Es ist hierbei jedoch zu berücksichtigen, dass erstens durch die Wasserbadtemperatur eine Zersetzung des Nucleons eintreten kann, und dass zweitens in dem ammoniumsulfathaltigen Filtrate trotz der Verdünnung mit Wasser noch andere phosphorhaltige Stoffe ausgefällt werden können. Hierüber soll die Untersuchung des Eisenniederschlags, der nach Sättigen mit Ammonsulfat erhalten wird, Klarheit bringen. Mit dieser Untersuchung ist Herr Smolny beschäftigt.

Ebenso wie Peptone in mit Kochsalz oder mit Ammonsulfat gesättigten Lösungen durch Ferrisalzlösungen, die mit dem betreffenden Salz gesättigt sind, gefällt werden,²⁾ so werden

1) Dass die Carniferrinniederschläge nicht, wie Kutscher vermuthet (diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 110), die nach den Methoden von Schmidt-Mülheim und Hofmeister fällbaren Substanzen enthalten, geht schon daraus hervor, dass sorgfältig dargestelltes Carniferrin völlig schwefelfrei ist.

2) M. Siegfried, diese Zeitschrift Bd. XXVII, S. 342.

albumoseartige Körper in Kochsalzgesättigten Lösungen durch Eisenchloridlösung, die mit Kochsalz gesättigt ist, wenn auch nicht vollständig, gefällt. Auf diese Weise wurden aus den wie oben beschrieben von Eiweiss und Phosphaten befreiten Auszügen der Kalbsmuskeln, denselben Auszügen, welche zu den Nucleonbestimmungen verwendet wurden, beträchtliche Fällungen erhalten. Dieselben bilden sich zunächst in grossen, zusammenhängenden Flocken. Nach Abfiltriren wurden sie mit gesättigter Kochsalzlösung zerrieben, abgenutscht, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und auf dem Wasserbade getrocknet.

Analysen:

I. Fällung.

1. 0,4293 g Substanz erf. 29,32 ccm. $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 9,56% N.
2. 1,3278 „ „ gaben 0,0216 g. $P_2O_7Mg_2$ = 0,45% P.

II. Fällung.

1. 0,5064 g Substanz erf. 29,8 ccm. $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 8,21% N.
2. 3,1571 „ „ gaben 0,1134 g $BaSO_4$ und 0,0364 g $P_2O_7Mg_2$
= 0,32% P und 0,32% S.

III. Fällung.

1. 0,5725 g Substanz erf. 33,5 ccm. $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 8,19% N.
2. 3,3478 „ „ gaben 0,0652 g $BaSO_4$ und 0,0631 g $P_2O_7Mg_2$
= 0,52% P und 0,26% S.

Die gleichen Niederschläge wurden aus durch Chlorcalcium und Ammoniak phosphatfrei gemachten, etwa 20%igen Lösungen von Fleischextract, und zwar aus halb und aus ganz mit Kochsalz gesättigten Lösungen gefällt.

Analysen:

I. Darstellung aus halb mit Kochsalz gesättigter Lösung.

1. 0,7210 g Substanz gaben 0,0061 g $P_2O_7Mg_2$ = 0,23% P.
2. 0,4352 „ „ erf. 25,6 ccm. $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 8,24% N.

II. Darstellung aus ganz mit Kochsalz gesättigter Lösung.

1. 0,4003 g Substanz erf. 22,95 $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 = 8,02% N.
2. 1,8174 „ „ gaben 0,0188 g $P_2O_7Mg_2$ = 0,28% P.

Die Schmelze der 1,8174 g Substanz war vor der Molybdänfällung nach Auflösen in Wasser auf dem Wasserbade wiederholt

angesäuerten Lösung des Rückstandes erzeugte Baryumchlorid auch bei längerem Stehen keine Trübung. Die Substanz enthielt also keine quantitativ bestimmbaren Mengen Schwefels, war jedoch nicht völlig schwefelfrei, da die äusserst empfindliche Schwefeltrockenprobe¹⁾ positiv, wenn auch schwach ausfiel. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, dass die Muskel-extracte eine schwefelfreie, albumoseartige Substanz enthalten. Versuche zur Isolirung dieser Substanz und Auffindung schwefelfreier Verdauungsalbumosen durch fractionirte Eisenfällungen in kochsalzhaltigen Lösungen hat Herr Natho begonnen. Diese Versuche werden auch entscheiden, ob der in den Fällungen stets beobachtete Phosphorgehalt der isolirten Substanz zukommt oder nicht.

Wenn auch die reichliche Ausscheidung der albumoseartigen Substanz bzw. der albumoseartigen Substanzen durch die Eisenfällung in kochsalzgesättigter Lösung keine ganz vollständige ist, so war doch anzunehmen, dass, wenn diese Substanz wesentlich bei der Bildung des Carniferrinniederschlags theiligt wäre, aus den Filtraten der Eisenfällungen in kochsalzgesättigten Lösungen Carniferrinniederschläge von bedeutend niedrigerem Verhältniss N:P als sonst erhalten werden müssten. Es wurden deshalb aus den Filtraten der Eisenfällungen Darstellung I und II (S. 527) nach dem Verdünnen mit Wasser Nucleonfällungen erzeugt.

Fällung aus Filtrat I.

1. 1,0710 g Substanz gaben 0,0470 g $P_2O_5 \cdot Mg_2 = 1,22\%$ P.
2. 0,5646 „ „ erf. 11,5 ccm. $\frac{n}{10}$ $H_2SO_4 = 2,87\%$ N.

Fällung aus Filtrat II.

1. 1,1504 g Substanz gaben 0,0312 g $P_2O_5 \cdot Mg_2 = 0,75\%$ P.
2. 0,9481 „ „ erf. 13,4 ccm. $\frac{n}{10}$ $H_2SO_4 = 1,97\%$ N.

Das Verhältniss N:P ist also im ersten Falle 2,4, im zweiten Falle 2,6, unterscheidet sich daher nicht von dem früher aus Fleischextractlösungen ohne vorherige Ausfällung mit Eisenchlorid in kochsalzgesättigter Lösung gefundenen. Da

1) M. Siegfried, Diese Zeitschrift Bd. XXVII, S. 346.

sowohl die Lösung des aus dem Carniferrin durch Einwirkung von Barythydrat zunächst entstehenden, durch Ammonsulfat aussalzbaren Produktes als auch die Lösung der aus diesem durch weitere Einwirkung von Barythydrat hervorgehenden Fleischsäure nach Sättigen mit Kochsalz mit kochsalzgesättigter Eisenchloridlösung Fällungen geben, ist anzunehmen, dass auch das Nucleon so gefällt wird. Diese Fällung scheint jedoch in den verwendeten Flüssigkeitsmengen nur sehr unvollständig zu sein. Sollte sich ergeben, dass bei der Bildung der Carniferrinniederschläge mehrere Substanzen betheiligt sind (siehe oben), so würde der durch Ammonsulfat aussalzbare Theil sicher auch durch Eisenchlorid in kochsalzgesättigter Lösung fällbar sein. Dass trotzdem im Filtrate dieser Fällung der Carniferrinniederschlag erhalten wurde, würde durch sehr unvollkommene Ausfällung dieser Substanzen unter den gegebenen Bedingungen zu erklären sein.

Zur Kenntniss der Nucleone.

Von

Dr. Th. Richard Krüger.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.)

Die Untersuchung bezweckte in erster Linie, die Löslichkeit des Muskel- und Milchnucleons in Salzlösungen festzustellen. Ferner sollte zugleich geprüft werden, ob sich diese Nucleone durch verschiedene Löslichkeit von einander unterscheiden. Da die Nucleone als solche sich bis jetzt nicht isoliren lassen, musste der mühsame Weg eingeschlagen werden, in Lösungen der Nucleone die Menge derselben zu bestimmen, diese Lösungen mit den entsprechenden Salzen zu sättigen und im Filtrate die Menge der Nucleone wieder zu ermitteln. Ebenso wurde das Verhalten der Nucleone gegenüber Pepsin und Trypsin untersucht, indem der Nucleongehalt vor und nach der Einwirkung der Enzyme festgestellt wurde. Ich habe fast durchweg Parallelbestimmungen ausgeführt.

Versuche mit Muskelnucleon.

Versuch I. Von einer Lösung von 100 g Fleischextract in 500 ccm. Wasser wurden in je 50 ccm. die Phosphate mit Chlorcalcium und Ammoniak ausgefällt, im Filtrate das Nucleon direkt bzw. nach Sättigen mit dem betreffenden Salze bei gewöhnlicher Temperatur, Filtriren, Auswaschen mit der betreffenden Salzlösung und Verdünnen mit Wasser bestimmt.

Je 50 ccm. gaben:

1. direkt

- a) 2,5924 g Nucleonfällung mit 4,60 % N
- b) 2,4439 „ „ „ 4,63 % N;

2. nach Sättigen mit NaCl
 - a) 1,3688 g Nucleonfällung mit 5,58 % N
 - b) 1,8078 „ „ 4,90 % N;
3. nach Sättigen mit MgSO_4
 - a) 2,6870 g Nucleonfällung mit 3,22 % N
 - b) 2,7536 „ „ 3,23 % N.

Versuch II. Eine wässrige Lösung von 100 g Fleisch-extract wurde von den Phosphaten befreit, das Filtrat auf 1000 ccm. gebracht. Der Phosphatniederschlag wurde also nicht völlig ausgewaschen, da es sich nicht um Bestimmung des Nucleons im Fleischextract handelte, sondern um Herstellung einer Lösung des Nucleons von bestimmtem Gehalte.

Je 100 ccm. der Lösung gaben:

1. direkt
 - a) 8,4502 g Nucleonfällung mit 2,12 % N
 - b) 7,8922 „ „ 2,37 % N;
2. nach Sättigen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in neutraler Lösung auf dem Wasserbade
 - a) 5,2714 g Nucleonfällung mit 0,92 % N und 1,06 % P
 - b) 4,6650 „ „ mit 0,99 % N;
3. nach Sättigen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in schwach ammoniakalischer Lösung
 - a) 5,3028 g Nucleonfällung mit 0,72 % N
 - b) 4,3684 „ „ 1,05 % N und 1,06 % P.

Versuch III. Phosphatfreie Lösung von Fleischextract wie in Versuch II.

Je 100 ccm. gaben:

1. direkt
 - a) 3,1418 g Nucleonfällung mit 5,42 % N
 - b) 3,1709 „ „ 5,31 % N.
2. nach Aussalzen mit Kochsalz in neutraler, ammoniakalischer und saurer Lösung auf dem Wasserbade
 - a) 1,6110 g Nucleonfällung mit 1,87 % N
 - b) 1,7494 „ „ 2,58 % N;
3. nach Aussalzen mit Ammonsulfat in neutraler, ammoniakalischer und saurer Lösung auf dem Wasserbade
 - a) 6,2268 g Nucleonfällung mit 0,38 % N
 - b) 6,4840 „ „ 0,43 % N;

Versuch IV. Es wurde ein eiweiss- und phosphatfreier Extract von 1700 g magerem Stierfleisch auf das Volumen von

2 Liter gebracht. Zu jeder Bestimmung wurden 500 ccm. der Lösung verwendet.

Bei der direkten Nucleonfällung wurde erhalten:

4,1838 g Niederschlag mit 2,17% N und 2,12% P.

Nach Sättigen mit Ammonsulfat bei neutraler Reaction lieferte das Filtrat:

4,1364 g Niederschlag mit 1,16% N und 1,7% P.

Versuch I zeigt, dass durch das Aussalzen mit NaCl und $MgSO_4$ bei gewöhnlicher Temperatur der Nucleonstickstoff nicht wesentlich vermindert wird. Vor dem Aussalzen enthielt das verwendete Volumen der Lösung 0,12 bzw. 0,11 g, nach dem Aussalzen mit Kochsalz 0,07 und 0,09 g, nach dem Aussalzen mit Magnesiumsulfat 0,09 und 0,09 g Nucleonstickstoff. Die Lösung in Versuch II enthielt 0,18 und 0,19 g Nucleonstickstoff; derselbe sank durch Aussalzen mit Ammonsulfat bei neutraler Reaction auf 0,05 und 0,05 g, ebenso bei ammoniakalischer Reaction auf 0,04 und 0,05 g. Durch Sättigen mit Kochsalz bei Wasserbadtemperatur und bei neutraler, saurer und ammoniakalischer Reaction (Versuch III) wurde der Nucleonstickstoff von 0,17 und 0,17 auf 0,03 und 0,045 g, durch Sättigen mit Ammonsulfat unter denselben Verhältnissen auf 0,02 und 0,03 g vermindert. Eine wesentliche Verminderung desselben durch Kochsalz scheint also nur durch vollständiges Sättigen in der Wärme stattzufinden. Diese Verminderung kann auch auf einer Zersetzung des Nucleons beruhen.

Nach Sättigen mit Ammonsulfat in der Wärme ist der Phosphor ebenfalls, jedoch nicht in dem Maasse wie der Stickstoff vermindert, sodass das Verhältniss von N : P sogar kleiner als 1 wird. Es soll hier eine weitere Untersuchung (vgl. dieses Heft S. 526) zeigen, ob bei der Sättigung mit Ammonsulfat in der Wärme eine Zersetzung des Nucleons eintritt, oder ob durch das Ammonsulfat eine Substanz ausgeschieden wird, welche sonst bei der Bildung des Carniferrinniederschlages theiligt ist.

Das Verhalten des Muskelnucleons gegen Pepsin und Trypsin sollten folgende Versuche prüfen:

Versuch V. In 2 Parallelversuchen wurden je 100 ccm.

der in Versuch III verwendeten Lösung auf 0,2% Salzsäure gebracht und nach Zusatz von einigen Cubikcentimetern Pepsin-Glycerins 4 Stunden auf Körpertemperatur erwärmt.

Es wurden erhalten:

- a) 1,7164 g Nucleonfällung mit 4,08% N
- b) 1,7726 „ „ „ 4,61% N.

Das ergibt in a) 0,07 g, in b) 0,08 g Nucleonstickstoff gegenüber dem ursprünglichen Gehalt der Lösung von 0,17 g, also eine wesentliche Verminderung.

Versuch VI. Je 100 ccm. einer phosphatfreien Fleisch-extractlösung gaben:

1. direkt

- a) 2,5440 g Nucleonfällung mit 3,40% N
- b) 2,4677 „ „ „ 3,20% N.

2. je 100 ccm. der Lösung wurden auf 0,3% Natriumcarbonat-gehalt gebracht und nach Zusatz von 4 ccm. Pankreatin-Glycerin 5,5 Stunden auf 40° erwärmt. Es wurden erhalten:

- a) 2,8342 g Nucleonfällung mit 2,52% N und 0,74% P.
- b) 2,5746 „ „ „ 2,53%.

Das ergibt in a) 0,07 g, in b) 0,065 g Nucleonstickstoff gegenüber dem ursprünglichen Gehalte der Lösung von 0,086 und 0,08 g.

Versuche mit Milchnucleon.

Versuch I. Die Lösungen, welche zu diesem und dem nächsten Versuche verwendet wurden, waren aus den Mutterlaugen, welche bei der technischen Darstellung des Milchezuckers gewonnen werden, hergestellt. Sie waren wie die Fleischextractlösungen phosphatfrei gemacht. In den einzelnen Bestimmungen wurden wieder gleiche Volumina der Lösung verwendet. Es wurden erhalten:

1. direkt

- a) 3,6036 g Nucleonfällung mit 2,37% N
- b) 3,2548 „ „ „ 2,89% N;

2. nach Sättigen mit Kochsalz bei gewöhnlicher Temperatur

- a) 3,6770 g Nucleonfällung mit 2,14% N
- b) 4,2994 „ „ „ 1,91% N;

3. nach Sättigen mit Magnesiumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur.

- a) 3,1130 g Nucleonfällung mit 2,13% N
- b) 3,7788 „ „ „ 1,79% N.

Versuch II: direkt.

3,4824 g Nucleonfällung mit 2,45% N.

Nach Sättigen mit Ammonsulfat bei Wasserbadtemperatur wurden weder, wenn die Sättigung bei neutraler, noch wenn sie bei ammoniakalischer Reaction geschah, Nucleonfällungen erhalten. Nach Sättigen mit Ammonsulfat bei saurer Reaction entstanden nur Spuren von Niederschlägen.

In Versuch I war durch Sättigen mit Kochsalz bei gewöhnlicher Temperatur der ursprüngliche Nucleonstickstoff von 0,085 und 0,094 auf 0,079 und 0,82 g, durch Sättigen mit Magnesiumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur auf 0,066 und 0,068 g gesunken. Nach Sättigen mit Ammonsulfat bei Wasserbadtemperatur (Versuch II) war überhaupt keine Nucleonfällung mehr zu erzielen. Hierin unterscheidet sich also wesentlich das Milchnucleon vom Muskelnucleon.

Versuch III. Aus 4 Liter Kuhmilch wurde eine phosphatfreie Lösung nach Ausfällung des Caseins und Albumins hergestellt, von welcher zu jeder Bestimmung gleiche Volumina verwendet wurden. Es wurden erhalten:

1. direkt

a) 1,2953 g Nucleonfällung mit 2,87% N = 0,037 g N

b) 1,3478 „ „ 2,71% N = 0,036 „ N:

2. die Lösungen wurden bei 0,3% Natriumcarbonatgehalt nach Zusatz von 4 ccm. Pankreatin-Glycerin in a) und b) 4 Stunden. in c) und d) 6 Stunden auf Körpertemperatur erwärmt. Es wurden erhalten:

a) 1,5078 g Nucleonfällung mit 0,78% N = 0,012 g N

b) 1,7744 „ „ 0,96% N = 0,017 „ N

c) 0,9967 „ „ 1,18% N = 0,012 „ N

d) 1,1130 „ „ 1,36% N = 0,015 „ N.

Während also der Nucleonstickstoff durch die tryptische Verdauung stark vermindert wurde, ergaben Versuche mit Pepsin nur eine unbedeutende Abnahme desselben.

Zur Kenntniss des Phosphors im Muskel.

Von

J. J. R. Macleod M. B.,
aus Aberdeen, Scotland.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.)

Dass die von den Nieren ausgeschiedenen Phosphate durch Muskelthätigkeit zunehmen, ist durch zahlreiche Arbeiten, besonders von Engelmann,¹⁾ Presyz,²⁾ Klug und Olsavszky³⁾ u. s. w. dargethan worden.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass diese Zunahme von dem Abbaue phosphorhaltiger Substanzen in den Muskeln herührt, aber Versuche, welche sich mit der Art und dem Material dieses Abbaues eingehender beschäftigen, sind nur in geringer Anzahl vorhanden, und auch diese sind durchaus nicht überzeugend.

Weyl und Zeitler⁴⁾ zeigten zwar, dass eine Zunahme der anorganischen Phosphate in tetanisirten Muskeln stattfindet, aber sie konnten keine Erklärung für diese Zunahme finden, sondern vermutheten nur, dass, weil die Zunahme nicht von einer Zerstörung des Lecithins abhängt, das Nuclein die organische Substanz sein müsse, von welcher die anorganischen Phosphate stammen; indessen kann dies keineswegs die Zu-

1) Du Bois-Reymond's Arch. 1871. S. 14.

2) Ungarisches Arch. f. Medicin. Bd. I. S. 38.

3) Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. LIV. S. 21.

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VI. S. 557.

nahme der anorganischen Phosphate erklären, denn die Muskeln enthalten nur eine sehr geringe Menge von Nucleoproteid.¹⁾

Die angewandte Methode war auch keineswegs eine einwandfreie, und zwar aus mehrfachen Gründen. Um das Lecithin zu extrahiren, wandten Weyl und Zeitler nur kalten Alkohol und Aether an, und es ist durch Liebermann²⁾ gezeigt worden, dass selbst durch Kochen mit diesen Reagentien nur ein Theil des Lecithins ausgezogen wird. Um die anorganischen Phosphate zu extrahiren, behandelten sie die lecithin-freien Rückstände mit kochendem Wasser mehrere Male je fünf Minuten lang. Dieses Verfahren kann aber, wie Kossel³⁾ und Miescher gezeigt haben, eine Zerstörung von Nuclein und somit eine incorrecte Vermehrung des anorganischen Phosphors zur Folge haben.

Ausser dem Nuclein gibt es aber noch andere organische phosphorhaltige Substanzen im Muskel, welche zu der Zeit, als Weyl und Zeitler ihre Arbeit machten, noch unbekannt waren, und aus deren Zersetzung sich die Vermehrung der anorganischen Phosphate im arbeitenden Muskel erklären lassen könnte. Eine solche Substanz ist das von Siegfried entdeckte Nucleon. Thatsächlich hat Siegfried⁴⁾ auch gefunden, dass in dem wässerigen Extract tetanisirter Muskeln sich weniger Nucleonstickstoff findet, als in demjenigen von ruhenden.

Auf den Vorschlag des Herrn Prof. Siegfried habe ich nun Versuche darüber angestellt, ob ebenso wie der Stickstoff auch der Phosphor des Nucleonmoleküls bei der Muskelarbeit abgespalten wird. Daraus liesse sich dann sowohl die Zunahme der anorganischen Phosphate im Muskelextract, als auch die Steigerung der Phosphate im Urin bei der Muskelthätigkeit — wenigstens theilweise — erklären.

1) Whitfield (Journ. of Physiol. Vol. XVI, S. 487) konnte kein Nucleoalbumin im Muskel finden: und Pekelharing (diese Zeitschr. Bd. XXII. S. 245) bei einer anderen Methode nur eine recht geringe Menge.

2) Pflüger's Arch. f. Physiologie. Bd. LIV, S. 573.

3) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. III. S. 284.

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI. S. 376.

Neben dem Nucleon habe ich auch den Gesamtphosphor im getrockneten Muskel und den anorganischen und organischen Phosphor in dem bei 60° C. bereiteten wässerigen Extracte bestimmt. Bei dieser Temperatur wird zwar (bei Verwendung von vielem Wasser und dreimaligem Wiederholen dieses Extrahirens) wohl der Gesamtgehalt des Muskels an Alkaliphosphaten ausgezogen, hingegen erleiden die organischen P-haltigen Verbindungen des Fleisches dadurch sicher nicht eine wesentliche Zersetzung.

Da der Wassergehalt des Muskels sehr beträchtlich je nach dem Alter des Thieres und nach dem Fettgehalt der Muskeln, variirt, und da der Wassergehalt durch Muskularbeit zunimmt,¹⁾ so wurde der Trockengehalt des Muskels bestimmt und alle Resultate auf Procente des getrockneten Muskels berechnet.

Der Versuch wurde an Hunden ausgeführt, welche jedes Mal wenigstens vier Tage lang mit Pferdefleisch gefüttert worden waren, vor dem Versuche jedoch einige Stunden gefastet hatten. Dieselben mussten dann mehrere Stunden in einer Tretmühle, die durch freundliche Vermittelung des Herrn Prof. N. Zuntz nach dessen Angaben construirt ist, laufen, so dass das Ermüden unter völlig normalen Bedingungen erfolgte.

Um Vergleichszahlen für die normalen Verhältnisse zu gewinnen, wurden fünf andere Hunde wenigstens zwölf Stunden lang ruhig gehalten. In beiden Fällen wurden die Hunde dann durch Verbluten getödtet. Die Muskeln der hinteren Extremitäten wurden darauf nach Möglichkeit von Fett, Nerven u. s. w. befreit und in der Fleischmaschine zerkleinert. Der so erhaltene Muskelbrei wurde gewogen und zwei kleine Portionen davon bei 100° C. bis zum constanten Gewichte getrocknet und so die Trockensubstanz des Muskels bestimmt.

Die trockene Masse wurde dann mit Aetznatron und Salpeter in der Silberschale verschmolzen und in der Lösung

1) Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1895, S. 345, und Halliburton in Schäfer's Textbook of Physiology, p. 95, wo eine Liste der Arbeiten über diese Frage gegeben wird.

der Schmelze der Phosphor durch Fällen mit molybdänsaurem Ammon, Lösen des gewaschenen Niederschlags in Ammoniak und Fällen mit ammoniakalischer Magnesiamixtur bestimmt. Auf diese Weise wurde somit der Gesamtposphor des trockenen Muskels ermittelt.

Die nicht zur Trockenbestimmung verwendete Muskelmasse wurde in zwei Theile getheilt und von jedem derselben ein Extract gemacht, und zwar wurden 800 g Muskel zunächst $\frac{3}{4}$ Stunden lang bei einer Temperatur zwischen 50 und 60° C. mit 1 $\frac{1}{2}$ Liter Wasser unter gutem Umrühren extrahirt. Das so gewonnene Extract wurde darauf durch ein Filtertuch colirt und das ausgepresste Fleisch wiederum $\frac{3}{4}$ Stunden lang mit 1 Liter Wasser extrahirt. Dasselbe Verfahren wurde ein drittes Mal wiederholt. Die vereinigten Extracte wurden darauf zur Coagulation des Eiweisses gekocht und nach dem Erkalten filtrirt. Das Filtrat wurde gemessen und bestimmte Volumina davon, welche 10 und 20 g des feuchten Muskels entsprachen, abgemessen.

Die 10 g Muskel entsprechende Menge wurde in einer Silberschale eingedampft, der Rückstand mit Aetznatron und Salpeter verschmolzen und der Phosphor in der oben angegebenen Weise bestimmt. Es wurde so der Gesamt-P-Gehalt des wässerigen Extractes ermittelt.

Zu der 20 g feuchten Muskels entsprechenden Menge des Extractes wurde CaCl_2 in 10%iger Lösung hinzugefügt und die Lösung mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Der die präformirte Phosphorsäure als Calciumphosphat enthaltende Niederschlag wurde in Salpetersäure gelöst und sein P-Gehalt abermals mittelst molybdänsauren Ammons und Magnesiamixtur ermittelt. Dies stellt uns den anorganischen Phosphor in dem wässerigen Extract dar.

Durch Abziehen des anorganischen von dem Gesamtposphor des wässerigen Extractes erhalten wir den organischen Phosphor des wässerigen Extractes.

Es ist unwahrscheinlich, dass bei Anwendung von CaCl_2 als Fällungsmittel des anorganischen Phosphors im wässerigen Extract organische P-haltige Substanzen — z. B. Inosin-

säure¹⁾ — mitgefällt werden; ebenso unwahrscheinlich ist es, dass hierbei eine Zersetzung solcher organischer Phosphatiger Substanzen stattfindet, und dadurch, wie dies etwa bei direkter Fällung mit Ammoniummolybdat in stark salpetersaurer Lösung in der Wärme der Fall wäre, die anorganischen Phosphate vermehrt erscheinen.

Zur Bestimmung des Gesamt-P und der anorganischen Phosphate im wässerigen Extracte waren, wie erwähnt, nur kleine Antheile desselben verwendet worden. Die Hauptmenge der Flüssigkeit diente zur Bestimmung des Nucleons. Die Eisenfällung wurde nach den Angaben von Siegfried,²⁾ Ide und Balke³⁾ vorgenommen. Die saure Reaction der Flüssigkeit wurde durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak vermindert, jedoch sorgfältig vermieden, dass die Reaction alkalisch oder neutral wurde.

In dem auf dem Wasserbade getrockneten, gepulverten und gewogenen Nucleoneisenniederschlag wurden sowohl der Stickstoff — nach Kjeldahl — wie der Phosphor durch Schmelzen mit Aetznatron und Salpeter bestimmt und beides für 100 g getrockneten Muskels berechnet.

I. Versuche an normalen Hunden.

Versuch I. Junger, 24 kg schwerer Jagdhund; gelegentlich einer Operation durch Verblutung aus der Vena Portae gestorben. Vorher mehrere Tage lang ruhig und während der letzten 12 Stunden nüchtern. Die Muskeln enthielten viel Fett.

I. Wassergehalt.

A. 10,1168 g feuchter Muskel lieferten

2,9318 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 71,02 %.

¹⁾ Um das Calciumsalz der Inosinsäure zu bilden, braucht man auf der einen Seite eine concentrirte Lösung von Inosinsäure und auf der anderen eine concentrirte Lösung von CaCl_2 , und das Salz scheidet sich nur nach längerem Stehen aus. (Haiser, Monatshefte für Chemie, 1895, S. 190.)

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI. S. 351.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI. S. 380.

- B. 10,522 g feuchter Muskel lieferten
2,9870 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 71,61 %.

Mittel = 71,31 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 28,69 %.

II. Gesamt-Phosphorgehalt des Muskels.

- A. 2,9318 g getrockneten Muskels gaben
0,0745 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,3547 % P.

- B. 2,9870 g getrockneten Muskels gaben
0,0785 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,3640 % P.

Mittel: 0,359 %.

III. Wässeriger Extract.

- A. 800 g feuchten Muskels gaben 3880 ccm. wässerigen Extractes

1. Gesamt-P. 48,5 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,869 g trockenen Muskels) lieferten 0,0495 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,238 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 97 ccm. wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,738 g Trockensubstanz) lieferten 0,0777 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,1888 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,0492 % P bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 3734 ccm. wässerigen Extractes (= 770 g feuchten Muskels = 220,9 Trockensubstanz) lieferten 6,895 g Eisenniederschlag mit 3,41 % N und 0,89 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,107 %.

Nucleon-P „ „ = 0,0278 %.

- B. Nur Nucleon wurde bestimmt, 3878,8 ccm. wässerigen Extractes (= 770 g feuchten Muskels = 220,9 Trockensubstanz) lieferten 7,304 g Eisenniederschlag mit 3,6 % N und 0,80 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,119 %.

Nucleon-P „ „ = 0,026 %.

Versuch II. Alter, 22½ kg schwerer Bullenbeisser, durch Verblutung aus den Carotiden getötet. Vorher mehrere Tage lang ruhend und während der letzten 12 Stunden nüchtern. Die Muskeln waren dunkelroth gefärbt und enthielten weniger Fett als in Nr. I.

I. Wassergehalt.

- A. 14,4722 g feuchter Muskel lieferten
4,2287 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 70,78 %.

B. 12,5875 g feuchter Muskel lieferten

3,6655 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 70,80 %.

Mittel = 70,79 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 29,21 %.

II. Gesamt-Phosphor.

A. 4,2287 g getrockneter Muskel gaben

0,1105 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,364 % P.

B. 3,6655 g getrockneter Muskel gaben

0,93 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,360 % P.

Mittel 0,362 %.

III. Wässeriger Extract.

A. 1040 g feuchten Muskels gaben 5387 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P verloren.

2. Anorganischer P. 103,6 ccm. wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,84 g Trockensubstanz) lieferten 0,092 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,2191 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P.

4. Nucleoneisenniederschlag. 5271,60 ccm. wässerigen Extractes (= 1010 g feuchten Muskels = 294 g Trockensubstanz) lieferten 8,526 g Eisenniederschlag mit 2,4 % N und 1,21 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,0693 %.

Nucleon-P „ „ 0,0350 %.

B. 1040 g feuchten Muskels gaben 5160 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 49,9 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,92 g Trockensubstanz) lieferten 0,0555 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,2671 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 100 ccm. wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 5,84 g Trockensubstanz) lieferten 0,092 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,2191 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,0488 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 5130 ccm. wässerigen Extractes (= 1010 g feuchten Muskels = 294 g Trockensubstanz) lieferten 7,807 g Eisenniederschlag mit 2,0 % N und 1,36 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,0544 %.

Nucleon-P „ „ 0,0372 %.

Versuch III. Junger, 16 $\frac{1}{2}$ kg schwerer Schäferhund, durch Verblutung aus den Carotiden getödtet. Vorher mehrere Tage lang ruhig und während 18 Stunden nüchtern. Die Muskeln waren hellroth und sehr weich, so dass sie sehr schwer zu zerkleinern waren; der Fettgehalt war mässig.

I. Wassergehalt.

A. 16,8910 g feuchter Muskel lieferten

4,7036 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 72,1 %.

B. 19,0990 g feuchter Muskel lieferten

5,2945 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 72,2 %.

Mittel 72,15 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels 27,85 %.

II. Gesamt-P.

A. 4,7035 g getrockneter Muskel gaben

0,1450 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,430 % P.

B. 5,2945 g getrockneter Muskel gaben

0,1560 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,411 % P.

Mittel 0,420 %.

III. Wässriger Extract.

A. 785 g feuchten Muskels gaben

3645 ccm. wässrigen Extractes.

1. Gesamt-P. 46,5 ccm. des wässrigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,785 g trockenen Muskels) lieferten 0,580 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,2908 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 93 ccm. des wässrigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,570 g trockenen Muskels) lieferten 0,095 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,2380 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,0528 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleon fehlt.

B. 1. Gesamt-P. 46,5 ccm. des wässrigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,785 g trockenen Muskels) lieferten 0,0615 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,3080 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 93 ccm. des wässrigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,570 g trockenen Muskels) lieferten 0,093 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,2333 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (Differenz) = 0,0747 % P.

4. Nucleoneisenniederschlag. 3366 ccm. wässerigen Extractes (= 705 g feuchten Muskels = 196,8 g Trockensubstanz) lieferten 3,3665 g Eisenniederschlag mit 3,2 % N und 1,65 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,051 %.

Nucleon-P „ „ 0,0288 %.

Versuch IV. 40 kg schwerer Bernhardiner (Abart) von mittlerem Alter; durch Verblutung aus den Carotiden getötet. Vorher nicht besonders ruhend, aber während 12 Stunden nüchtern. Der Fettgehalt der Muskeln war gering.

I. Wassergehalt.

- A. 6,2359 g feuchten Muskels lieferten

1,5155 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 75,7 %.

- B. 5,1715 g feuchten Muskels lieferten

1,2670 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 75,5 %.

Mittel 75,6.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels 24,4 %.

II. Gesamt-P.

- A. 1,5155 g getrockneter Muskel gaben

0,0415 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,382 % P.

- B. 1,2670 g getrockneter Muskel gaben

0,0415 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,457 % P.

Mittel 0,419 %.

III. Wässeriger Extract.

- A. 800 g feuchten Muskels gaben 3453 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 43,2 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,44 g getrockneten Muskels) lieferten 0,0540 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,307 %, P bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 86,4 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 4,88 g trockenen Muskels) lieferten 0,075 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,215 % P bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (Differenz) = 0,092 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 3280,3 ccm. des wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 188,6 g Trockensubstanz) lieferten 4,0963 g Eisenniederschlag mit 2,66 % N und 1,76 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,057 %.

Nucleon-P „ „ 0,0384 %.

B. 800 g feuchten Muskels gaben 3905 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 48,8 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,44 g trockenen Muskels) lieferten 0,058 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,311 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
2. Anorganischer P. 97,6 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 4,88 g trockenen Muskels) lieferten 0,076 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,218 % P. bezogen auf Trockensubstanz.
3. Organischer P (Differenz) = 0,137 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
4. Nucleoneisenniederschlag. 3709,8 ccm. des wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 188 g Trockensubstanz) lieferten 3,5640 g Eisenniederschlag mit 2,8 % N und 2,02 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,529 %.

Nucleon-P „ „ 0,0382 %.

Versuch V. Alter, 35 kg schwerer Ziehhund; durch Verblutung aus den Carotiden getötet. Vorher mehrere Tage lang ruhig und während der letzten 12 Stunden nüchtern. Die Muskeln waren dunkelroth und der Fettgehalt war mässig.

I. Wassergehalt.

A. 11,3115 g feuchter Muskel lieferten

2,8530 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 74,7 %.

B. 13,2705 g feuchter Muskel lieferten

3,0815 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 75,9 %.

Mittel = 75,3 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 24,7 %.

II. Gesamt-P.

A. 2,8530 g getrockneter Muskel gaben

0,0778 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,378 % P.

B. 3,0815 g getrockneter Muskel gaben

0,0778 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,350 % P.

Mittel = 0,367 %.

III. Wässriger Extract.

A. 800 g feuchten Muskels gaben 4162 ccm. wässerigen Extractes

1. Gesamt-P. 52 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,47 g trockenen Muskels) lieferten 0,0510 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,287 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 104 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 4,54 g trockenen Muskels) lieferten 0,0705 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,198 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,089 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 3944 ccm. des wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 187,7 g P Trockensubstanz) lieferten 5,1855 g Eisenniederschlag mit 2,72 % N und 1,33 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,074 %.

Nucleon-P „ „ = 0,042 %.

B. 800 g feuchten Muskels gaben 4461 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 55,7 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,47 g trockenen Muskels) lieferten 0,0545 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,307 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 111,4 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 4,54 g trockenen Muskels) lieferten 0,079 g $Mg_3P_2O_7$, entsprechend 0,222 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,085 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 4238,8 ccm. des wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 187,7 g Trockensubstanz) lieferten 6,1480 g Eisenniederschlag mit 2,20 % N und 1,39 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,071 %.

Nucleon-P „ „ = 0,045 %.

Versuch VI. Alter, 40 kg. schwerer Zieh hund, arbeitete 20 Min. lang in der Treitmühle, dann musste das Experiment unterbrochen werden, da hochgradige Dyspnoe eintrat; darauf wurde das Thier durch Verblutung aus den Carotiden getödtet; das Blut war sehr dunkel; die sofort nachher herauspräparirten Muskeln zeigten keine Todtenstarre; ihr Fettgehalt war mässig.

I. Wassergehalt.

A. 8,7185 g feuchter Muskel lieferten

2,3730 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 72,7 %.

B. 13,8925 g feuchter Muskel lieferten

3,8213 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 72,4 %.

Mittel 72,55 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 27,45 %.

- A. 2,3730 g getrockneter Muskel gaben
 $0,0570 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,335\% \text{ P.}$
- B. 3,8213 g getrockneter Muskel gaben
 $0,0900 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,329\% \text{ P.}$
 Mittel = **0,332 %**.

III. Wässeriger Extract.

- A. 800 g feuchten Muskels gaben 3800 ccm. wässerigen Extractes.
1. Gesamt-P. 47,5 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,745 g trockenen Muskels) lieferten $0,0475 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend $0,240\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 2. Anorganischer P. 95 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,490 g trockenen Muskels) lieferten $0,0723 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend $0,185\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 3. Organischer P (als Differenz berechnet) = $0,057\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 4. Nucleoneisenniederschlag. 3610 ccm. wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 208,6 g Trockensubstanz) lieferten 3,3315 g Eisenniederschlag mit $3,0\% \text{ N}$ und $1,88\% \text{ P}$.
 Nucleon-N der Trockensubstanz = $0,0478\%$.
 Nucleon-P „ „ = $0,0300\%$.
- B. 800 g feuchten Muskels gaben 3676 ccm. wässerigen Extractes.
1. Gesamt-P. 46 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,745 g trockenen Muskels) lieferten $0,0505 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend $0,255\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 2. Anorganischer P. 92 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,490 g trockenen Muskels) lieferten $0,0730 \text{ g Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend $0,185\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 3. Organischer P (als Differenz berechnet) = $0,069\% \text{ P}$, bezogen auf Trockensubstanz.
 4. Nucleoneisenniederschlag. 3472 ccm. des wässerigen Extractes (= 760 g feuchten Muskels = 208,6 g Trockensubstanz) lieferten 2,4895 g Eisenniederschlag mit $3,45\% \text{ N}$ und $1,87\% \text{ P}$.
 Nucleon-N der Trockensubstanz = $0,0415\%$.
 Nucleon-P „ „ = $0,0298\%$.

Versuch I. 18 kg schwerer Schäferhund von mittlerem Alter, 48 Stunden nüchtern; arbeitete 3 1/2 Stunden; darauf verblutet aus den Carotiden. Das Blut war nicht so dunkel wie in Vers. VI (S. 545). Die Todtenstarre trat circa 20 Minuten nach dem Tode ein. Muskeln dunkelroth; Fettgehalt mässig.

I. Wassergehalt.

A. 10,2805 g feuchter Muskel lieferten

2,8230 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 72,54%.

B. 12,4530 g feuchten Muskel lieferten

3,3835 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 72,83%.

Mittel 72,68%.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 27,32%.

II. Gesamt-P.

A. 2,8230 g getrockneter Muskel gaben

0,880 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,436% P.

B. 3,3835 g getrockneter Muskel gaben

1,040 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,428 P.

Mittel 0,432%.

III. Wässeriger Extract.

A. 700 g feuchten Muskels gaben 3385 ccm. des wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 48 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,732 g Trockensubstanz) lieferten 0,0555 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,281% P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 96 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,464 g Trockensubstanz) lieferten 0,0930 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,237% P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,044% P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag 3193 ccm. des wässerigen Extractes (= 660 g feuchten Muskels = 180 g Trockensubstanz) lieferten 3,3740 g Eisenniederschlag mit 2,2% N und 1,68% P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,043%.

Nucleon-P „ „ = 0,033%.

B. 700 g feuchten Muskels gaben 3605 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 50,1 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,732 g Trockensubstanz) lieferten

0,0010 g $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,229 % P bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 100,2 ccm. des wässerigen Extractes (= 5,464 g Trockensubstanz) lieferten 0,0855 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend, 0,229 % P bezogen auf Trockensubstanz.
3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,030 % P. bezogen auf Trockensubstanz.
4. Nucleoneisenniederschlag 3402,6 ccm. des wässerigen Extractes (= 660 g feuchten Muskels = 180 g Trockensubstanz) lieferten 3,9690 g Eisenniederschlag mit 2,1 % N und 1,66 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,046 %.

Nucleon-P „ „ = 0,036 %.

Versuch II. Junge, 14 $\frac{1}{2}$ kg schwere Schäferhündin; 12 Stunden lang nüchtern. Arbeitete in der Treitmühle 4 $\frac{1}{4}$ Stunden; verblutet; die Todtenstarre kam 15 Minuten nach dem Tode zum Vorschein. Blut dunkel. Der Fettgehalt war mässig.

I. Wassergehalt.

A. Verloren.

- B. 16,3050 g feuchter Muskel lieferten
4,1685 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 74,4 %.

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 25,6 %.

II. Gesamt-P.

A. Verloren.

- B. 4,1685 g getrockneter Muskel gaben
0,1440 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,4833 % P.
Mittel 0,483 %.

III. Wässriger Extract.

A. 600 g. feuchten Muskels gaben 2935 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 49 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,56 g Trockensubstanz) lieferten 0,0545 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,296 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
2. Anorganischer P. 98 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,12 g Trockensubstanz) lieferten 0,0920 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,250 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
3. Organischer P (Differenz) = 0,046 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
4. Nucleoneisenniederschlag 2739 ccm. des wässerigen Extractes (= 560 g feuchten Muskels = 143,3 g Trocken-

und 1,39 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,074 %.

Nucleon-P „ „ = 0,032 %.

B. 600 g feuchten Muskels gaben 2864 ccm. des wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 47,5 ccm. des Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,56 g Trockensubstanz) lieferten 0,0535 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,289 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 95 ccm. des Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,12 g Trockensubstanz) lieferten 0,0915 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,250 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,039 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 2674 ccm. des wässerigen Extractes (= 560 g feuchten Muskels = 143,3 g Trockensubstanz) lieferten 2,6345 g Eisenniederschlag mit 2,85 % N und 1,57 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,052 %.

Nucleon-P „ „ = 0,030 %.

Versuch III. Junge, 18 $\frac{1}{2}$ kg schwere Schäferhündin; 12 Stunden lang nüchtern. Arbeitete in der Treitmühle 6 Stunden. Die Verblutung dauerte eine Stunde. Die Todtenstarre kam später (45 Minuten) wie in Nr. II zum Vorschein. Der Fettgehalt war mässig.

I. Wassergehalt.

A. 12,2290 g feuchten Muskels lieferten
3,0400 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels 75,74 %.

B. 12,0145 g feuchter Muskel lieferten 3,0850 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 75,74 %.

Mittel = 75,44

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 24,26 %.

II. Gesamt-P.

A. 3,0400 g getrockneten Muskels lieferten 0,1080 g. $M_2P_2O_7$
= 0,496 % P.

B. 2,915 g getrockneten Muskels lieferten 0,0975 g $Mg_2P_2O_7$
= 0,466 % P.

Mittel 0,481 % P.

III. Wässeriger Extract.

A. 600 g feuchten Muskels gaben 3300 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 55 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,56 g Trockensubstanz) lieferten 0,0510 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,289 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

(= 20 g feuchten Muskels = 4.912 g Trockensubstanz) lieferten 0,0950 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,268 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,021 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag 3080 ccm. des wässerigen Extractes (= 560 g feuchten Muskels = 137,5 g Trockensubstanz) lieferten 4,0650 g Eisenniederschlag mit 3,2 % N und 0,59 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,094 %.

Nucleon-P „ „ = 0,016 %.

B. 600 g feuchten Muskels gaben 2775 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 46,2 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,456 g Trockensubstanz) lieferten 0,0495 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,280 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

2. Anorganischer P. 92,4 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 4,912 g Trockensubstanz) lieferten 0,0920 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,260 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,020 % P, bezogen auf Trockensubstanz.

4. Nucleoneisenniederschlag. 2590,4 ccm. des wässerigen Extractes (= 560 g feuchten Muskels = 137,5 g Trockensubstanz) lieferten 4,1805 g Eisenniederschlag mit 3,38 % N und 0,50 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz = 0,102 %.

Nucleon-P „ „ = 0,015 %.

Versuch IV. 16 $\frac{1}{2}$ kg schwerer Bullenbeißer von mittlerem Alter, 12 Stunden lang nüchtern; arbeitete 5 $\frac{1}{4}$ Stunden; darauf verblutet aus den Carotiden. Die Todtenstarre trat circa 30 Minuten nach dem Tode ein. Fettgehalt gross.

I. Wassergehalt.

A. 11,5595 g feuchter Muskel lieferten 3,3605 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 70,9 %.

B. 12,8465 g feuchter Muskel lieferten 3,9655 g Trockensubstanz.

Wassergehalt des feuchten Muskels = 70,7 %.

Mittel 70,8

Daher Trockensubstanz des feuchten Muskels = 29,2 %.

II. Gesamtposphor.

A. 3,3605 g getrockneter Muskel gaben 0,0930 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,384 % P.

B. 3,9655 g getrockneter Muskel gaben 0,1145 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,376 % P.

Mittel 0,380 % P.

A. 600 g feuchten Muskels gaben 3750 ccm. wässerigen Extractes.

1. Gesamt-P. 62,5 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,92 g Trockensubstanz) lieferten 0,0535 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,252 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
2. Anorganischer P. 125 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,84 g Trockensubstanz) lieferten 0,0905 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,215 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
3. Organischer P (als Differenz berechnet) = 0,037 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
4. Nucleoneisenniederschlag. 3562 ccm. des wässerigen Extractes (= 570 g feuchten Muskels = 166,4 g Trockensubstanz) lieferten 4,7060 g Eisenniederschlag mit 2,45 % N und 0,73 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,069 %.

Nucleon-P „ „ 0,020 %.

B. 450 g feuchten Muskels gaben 2925 ccm. des Extractes.

1. Gesamt-P. 65 ccm. des wässerigen Extractes (= 10 g feuchten Muskels = 2,92 g Trockensubstanz) lieferten 0,055 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,260 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
2. Anorganischer P. 130 ccm. des wässerigen Extractes (= 20 g feuchten Muskels = 5,84 g Trockensubstanz) lieferten 0,0965 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, entsprechend 0,231 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
3. Organischer P (Differenz) = 0,029 % P, bezogen auf Trockensubstanz.
4. Nucleoneisenniederschlag 2730 ccm. des wässerigen Extractes (= 420 g feuchten Muskels = 122,6 g Trockensubstanz) lieferten 3,1530 g Eisenniederschlag mit 2,25 % N und 0,60 % P.

Nucleon-N der Trockensubstanz 0,057 %.

Nucleon-P „ „ 0,0155 %.

Der besseren Uebersichtlichkeit halber sind die Mittelwerthe aus den sämmtlichen vorerwähnten P-Bestimmungen in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt. Ich gebe auch die Zahlen für die Verhältnisse, in welchen die wichtigsten dieser Werthe zu einander stehen.

I. Versuche an ruhenden Hunden.

		100 g getrockneter Muskel enthalten:										Die Verhältnisse, in welchen die wichtigsten Werthe zu einander stehen.			
Nummer	Alter	A	B	C	D	E	F	G	H	Wasser- löslicher P:		Wasser- unlöslicher P:	Organischer P: Anorgan. P		Organ. P des wässrigen Extractes minus Nucleon-P Nucleon-P
		Gesamti- phosphor	Gesamti- phosphor	Anorgani- scher Phosphor	Organi- scher Phosphor (Differenz B-C)	Wasser- un- löslicher Phosphor (Differenz A-B)	Nucleon-		Organischer Phosphor des wässrigen Extractes minus Nucleon-P (= D-F)	B = A	Gesammt-P = E = A	im Wasser- extract	D = C		
							P	N							
1	2 Jahr	0,359	0,238	0,188	0,049	0,121	0,026	0,113	0,023	1 : 1,50	1 : 2,9	1 : 3,9	1 : 3,9	1 : 1,1	
2	7 Jahr	0,362	0,267	0,219	0,048	0,095	0,036	0,057	0,012	1 : 1,35	1 : 3,8	1 : 4,5	1 : 4,5	1 : 3	
3	1 1/2 Jahr	0,420	0,299	0,235	0,064	0,121	0,029	0,051	0,035	1 : 1,40	1 : 3,4	1 : 3,6	1 : 3,6	1 : 0,82	
4	3 Jahr	0,419	0,304	0,216	0,098	0,088	0,038	0,057	0,060	1 : 1,37	1 : 4,7	1 : 2,2	1 : 2,2	1 : 0,63	
5	7 Jahr	0,367	0,297	0,210	0,087	0,070	0,043	0,072	0,044	1 : 1,27	1 : 5,2	1 : 2,4	1 : 2,4	1 : 1,0	
6*)	9 Jahr	0,332	0,247	0,181	0,063	0,085	0,029	0,044	0,034	1 : 1,34	1 : 3,9	1 : 2,9	1 : 2,9	1 : 0,82	
Durchschnitt:		0,376	0,275	0,208	0,068	0,097	0,038	0,066	0,034	1 : 1,36	1 : 1,87	1 : 3	1 : 3	1 : 1	

*) Arbeitete 20 Minuten in der Trittmühle (siehe Seite 546).

II. Versuche an ermüdeten Hunden.

		100 g getrockneter Muskel enthalten:										Die Verhältnisse, in welchen die wichtigsten Werthe zu einander stehen.				
Nummer	Alter	A	B	C	D	E	F	G	H	Wasser-löslicher P:	Wasser-unlöslicher P:	Organischer P: Anorgan. P: im Wasser-extract	Organ. P.d wässrigen Extractes minus Nucleon-P	H = F		
		Gesamt-Phosphor	Gesamt-Phosphor im Wassereextract	Anorganischer Phosphor (B - C)	Organischer Phosphor (Differenz A - B)	Wasser-löslicher Phosphor (Differenz A - B)	Nucleon-		Organischer Phosphor des wässrigen Extractes minus Nucleon-P (= D - F)	Gesamt-P		D = E	Nucleon-P			
							P	N		B = A	E = A					
1	4 Jahr	0,492	0,270	0,233	0,037	0,162	0,034	0,044	0,003	1 : 1,60	1 : 2,6	1 : 6,3	1 : 12	1 : 12		
2	6 Monat	0,483	0,292	0,250	0,042	0,191	0,032	0,063	0,010	1 : 1,64	1 : 2,5	1 : 5,9	1 : 3,9	1 : 3,9		
3	6 1/2 Mon.	0,481	0,284	0,264	0,020	0,197	0,015	—	0,005	1 : 1,69	1 : 2,4	1 : 13,2	1 : 4	1 : 4		
4	4 Jahr	0,380	0,266	0,223	0,043	0,120	0,017	0,063	0,026	1 : 1,42	1 : 3,1	1 : 5,2	1 : 0,655	1 : 0,655		
Durchschnitt:		0,444	0,278	0,242	0,035	0,166	0,024	0,056	0,011	1 : 1,6	1 : 2,6	1 : 7	1 : 2,1	1 : 2,1		

zwar der Gesammtphosphorgehalt im ruhenden Hundemuskel beträchtlich variirt, dass aber die Verhältnisse der verschiedenen Gruppen unter einander ziemlich constant bleiben.

Der Gesammtphosphor (A Tab. I) hat einen Durchschnittswerth von 0,376% P und variirt zwischen 0,332% P und 0,420% P, wobei in der Regel die grösseren Zahlen von jungen, die niedrigeren von alten Hunden stammen. Nur der Hund in Versuch I zeigt niedrige Werthe, obgleich er ein junges Thier war.

Der Phosphor, welcher in den wässerigen Extract übergeht (B Tab. I), bildet im Allgemeinen 73% des Gesammtphosphors, und von dem Phosphor des wässerigen Extractes selbst sind wieder 75% anorganisch und 25% organisch. Von diesem letzteren organisch gebundenen Phosphor, welcher in den wässerigen Extract übergeht, sind durchschnittlich 50% Nucleonphosphor (wie aus der letzten Columne der Tabelle I ersichtlich ist). Die übrigen 50% gehören wahrscheinlich nur zum kleinen Theile der Inosinsäure an, welche zwar, wie Liebig¹⁾ und Hauser²⁾ gezeigt haben, in Wasser löslich ist. und welche nach Hauser organisch gebundenen Phosphor besitzt, von der aber der Muskel nur äusserst geringe Mengen enthält.

Was für Stoffe sind es nun neben der Inosinsäure, welche diesen nicht durch Eisen fällbaren organischen Phosphor enthalten? Zunächst war daran zu denken, dass vielleicht die Eisenfällung des Nucleons unvollständig gewesen wäre. Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurden zwei Versuche in der nachstehenden Weise angestellt. Nachdem man den Nucleoneisenniederschlag sich hatte setzen lassen, wurde die darüber befindliche Flüssigkeit abgossen und in einer grossen Schale zum Kochen erhitzt. Dazu wurde dann verdünntes Ammoniak gegeben, bis die Reaction eben alkalisch wurde, und FeCl_3 -Lösung in geringem Ueberschuss hinzugefügt. Es bildete sich

1) Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. LXII, S. 317.

2) Monatshefte für Chemie. 1895. S. 190.

ein neuerlicher Niederschlag. Derselbe lieferte nach dem Verschmelzen mit Aetznatron und Salpeter keine Spur Phosphorsäure und enthielt Stickstoff, der jedenfalls von Albumosen herrührt.

Daraus ergibt sich, dass die Fällung des Nucleons eine vollständige war. Der restliche organische Phosphor des wässerigen Extractes ist daher nicht auf Rechnung des nicht-gefällten Nucleons zu setzen. Ebenso wenig dürfte er wohl aus dem Nuclein oder Lecithin des Muskels stammen. Es erscheint demnach wahrscheinlich, dass der Hundemuskel ausser dem Nucleon noch andere wasserlösliche Verbindungen enthält, in welchen organisch gebundener Phosphor vorhanden ist.

Der Nucleonphosphor, ausgedrückt in Procenten des getrockneten Muskels, ist unserer Tabelle zufolge eine ziemlich constante Grösse; hingegen schwankt der Nucleonstickstoff etwas mehr.

Gehen wir nun zu den Versuchen an ermüdeten Hunden über, so sehen wir, dass die hauptsächlichste, durch die Muskelarbeit bewirkte Veränderung im Phosphorgehalt des Muskels darin besteht, dass der organische Phosphor im wässerigen Extract sehr beträchtlich vermindert wird.

Diese Verminderung betrifft, wie die Tabelle lehrt, zum Theile den Phosphor des Nucleons, in der Hauptsache aber die anderen oben erwähnten organisch phosphorhaltigen Extractivstoffe des Muskels.

Besonders in den Versuchen III und IV ist der Phosphor des Nucleons sehr deutlich herabgesetzt (Tab. II F), also in jenen Versuchen, in welchen die Ermüdung am weitesten getrieben worden war. Diese Resultate stimmen mit denen, welche Siegfried¹⁾ bei arbeitenden Hunden erhalten, insofern überein, als in dem Versuch III von Siegfried, bei dem die Arbeit in der Leistung eines 1,5-stündigen Weges bestand, nur wenig Nucleon verbraucht wurde, während die tetanisirten Muskeln beträchtlichen Nucleonschwund aufwiesen.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 377.

Entsprechend der Verminderung des gesamten wasserlöslichen organischen Phosphors zeigt sich eine beträchtliche Zunahme in den wasserlöslichen anorganischen Phosphaten (Natrium- und Kaliumphosphat), und es ist sehr wahrscheinlich, dass in eben dieser Form der verbrauchte Phosphor auch den Muskel verlässt und in das Blut übergeht, um durch die Nieren ausgeschieden zu werden. Ich beabsichtige, auf verschiedene andere Weise diese Sache noch weiter zu verfolgen.

Der Gesamtposphor des wässerigen Extractes bleibt ziemlich derselbe wie bei den ruhenden Hunden, nur das Verhältniss zwischen dem organischen und anorganischen Phosphor desselben ($\frac{D}{C}$ Tab. II) ist anstatt 1:3 (bei ruhenden Hunden) 1:5 und 1:6 in den Versuchen I, II und IV, und sogar 1:13 in Versuch III.

Sehr auffallend ist, dass der Gesamtposphor des Muskels durch die Arbeit zuzunehmen scheint (siehe A Tab. II); besonders deutlich ist dies in Experiment II und III, wo indessen die Zunahme, theilweise wenigstens, mit der Thatsache zusammenhängen kann, dass die Thiere sehr jung (5—6 Monate) waren und also — wie Bunge gezeigt hat — relativ mehr anorganische Substanzen (also auch Erdphosphate) in ihren Geweben enthalten müssen, als die älteren Thiere.

Da nun bei der Thätigkeit der Muskeln der Gesamtposphor (A Tab. II) zunimmt, der Phosphor des wässerigen Extractes hingegen unverändert bleibt, so wächst natürlich die Differenz A—B (oder E Tab. II), d. h. der wasserunlösliche Phosphor zeigt eine Zunahme, ohne dass der wasserlösliche Phosphor vermindert erscheint. Vielleicht hängt die erwähnte Zunahme mit der Thatsache zusammen, dass aus den zerstörten organischen Substanzen auch Phosphate der Erdalkalien gebildet werden, oder dass der Phosphor, welcher dem Muskel durch das Blut zugeführt wird, bei der Regeneration seiner Substanz in wasserunlöslichen organischen Verbindungen — Lecithin oder Nuclein? — aufgestapelt wird.

Ich habe weiter gesucht, ob in den ruhenden und ermüdeten Hundemuskeln Bernsteinsäure vorkommt. Die

hierbei angewandte Methode war die von Siegfried¹⁾ angegebene, welche sich bei einer Prüfung mittelst zugesetzter reiner Bernsteinsäure als sehr verlässlich erwies. Dieselbe besteht bekanntlich in Extraction des Muskels mit Alkohol, Behandlung des in Wasser gelösten Rückstandes der alkoholischen Flüssigkeit mit einem kleinen Ueberschusse von Barythydrat auf dem Wasserbade, Zersetzung der gebildeten Barytsalze mit wenig verdünnter Salzsäure in der Kälte und Ausäthern der Zersetzungsflüssigkeit. Es wurden so in zwei Versuchen an ruhenden und in zwei an ermüdeten Hunden erstens direkt alkoholische Auszüge, zweitens auch die durch Extraction mit salzsäurehaltigem Alkohol erhaltenen Auszüge auf das Vorhandensein von Bernsteinsäure untersucht.

Weder in ruhenden²⁾ noch in erschöpften Muskeln konnte ich auf diese Weise Bernsteinsäure nachweisen.

Die hauptsächlichsten Resultate meiner Untersuchungen sind also, kurz gefasst, die folgenden:

1. Durch Muskelarbeit wird der organisch gebundene Phosphor des wässerigen Muskelextractes stark vermindert.
2. Dementsprechend werden die anorganischen Phosphate des wässerigen Muskelextractes vermehrt.
3. Der Nucleonphosphor im wässerigen Muskelextracte wird nur durch intensive Muskelanstrengung wesentlich vermindert.
4. Vor Allem wird der nicht dem Nucleon angehörige organische Phosphor des wässerigen Extractes durch Muskelarbeit sehr deutlich vermindert.

Die Versuche, über welche hier berichtet wurde, geben uns eine vorläufige Orientirung über das Verhalten der phosphor-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 370.

2) Blumenthal, Virchow's Arch. f. Pathologie, Bd. CXXXVII, S. 539, konnte mit einer anderen Methode gleichfalls keine Bernsteinsäure in ruhenden Muskeln finden.

haltigen Substanzen während der Arbeit. Sie geben uns **aber** keine Einsicht, welche Stoffe es neben dem Nucleon sind, die bei der Muskelthätigkeit verbraucht werden.

Weitere Untersuchungen in dieser Richtung behalte ich mir vor.

Zum Schluss erfülle ich die angenehme Pflicht, **Herrn** Prof. M. Siegfried für die gebotene Anregung und sehr freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit und **Herrn Dr.** Burian für seine unermüdliche Unterstützung bei allen meinen Arbeiten im hiesigen Laboratorium meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin.

Von
stud. med. **Emil Marcus.**

Aus dem chemisch-pathologischen Laboratorium der k. k. Kranken-Anstalt
«Rudolf-Stiftung». (Vorstand: Dr. Ernst Freund.)

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.)

Die Thatsache, dass im Blutserum zweierlei Eiweisskörper vorkommen, von denen der eine in Wasser löslich, der andere in Wasser unlöslich ist, war schon Scherer, Lehmann und Zimmermann¹⁾ bekannt.

Panum²⁾ hat die in Wasser unlösliche Substanz als Serumcasein der in Wasser löslichen, dem Serumalbumin, gegenübergestellt.

Th. Weyl³⁾ hat schliesslich dem in Wasser unlöslichen Eiweisskörper des Serums den Namen Serumglobulin gegeben, und seitdem theilt man allgemein die Eiweisskörper des Blutserums in Serumalbumin und Serumglobulin ein.

Im Hoppe-Seyler'schen Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse (5. Auflage 1893) findet sich bei der Eintheilung der Eiweisskörper folgende Unterscheidung zwischen Albumin und Globulin: Albumin ist in Wasser, Salzen und verdünnten Säuren löslich und auch nicht durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausfällbar.

1) Müller's Archiv, 1154, 377.

2) Virchow's Archiv III, 251; IV 17 u. 419.

3) Th. Weyl, Beiträge zur Kenntniss thierischer und pflanzlicher Eiweisskörper. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. I, 1877—78.

Globuline sind unlöslich in Wasser, löslich in verdünnten Salzlösungen und aus diesen Lösungen durch Verdünnen mit viel Wasser fällbar. Desgleichen lässt sich die Ausfällung des genannten Körpers durch Sättigung der neutralisirten Lösung mit Magnesiumsulfat bei $+ 30^{\circ}$ bewirken.

Hammarsten gibt in seinem Lehrbuche¹⁾ folgende Charakteristik an: «Albumine sind in Wasser löslich und werden durch Zusatz von ein wenig Säure oder Alkali nicht gefällt.» Weiter führt er an, dass sie von NaCl und Magnesiumsulfat nur bei gleichzeitigem Essigsäurezusatz gefällt werden.

Von den Globulinen heisst es:

«Diese Eiweisskörper sind unlöslich in Wasser, lösen sich in verdünnten Neutralsalzlösungen. Diese Lösungen scheiden bei genügender Verdünnung mit Wasser das Globulin wieder unverändert aus. Die Globuline lösen sich in Wasser bei Zusatz von sehr wenig Alkali u. s. w.»

Die Menge des Serumglobulins wurde ursprünglich auf den vierten bis fünften Theil des Serumalbumins geschätzt. Als Beleg hierfür führe ich Analysen von Hammarsten und Burkhardt an, die mit der Methode, das Globulin durch Dialyse zu bestimmen, gewonnen sind.

I. Resultate von Hammarsten.²⁾

Serumart.	Paraglobulin mit Dialyse gefällt.
Pferdeblutserum	{ 0,830 ‰ 0,955 ‰ 0,715 ‰
Hundeblutserum	{ 1,115 ‰ 1,066 ‰

¹⁾ Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie. Dritte Aufl. 1895.

²⁾ Hammarsten, Ueber das Paraglobulin. Pflüger's Archiv. Bd. 17 und 18.

II. Resultate von Burkhardt im Hundeblutse

Stickstoffgehalt des Gesamt- eiweisses.	Stickstoffgehalt des durch Dialys gewonnenen Globulins.	
	1. Parallelversuch.	2. Parallelversuch
7,04 ‰	2,22 ‰	2,23 ‰
7,26 ‰	1,94 ‰	2,04 ‰
5,97 ‰	0,97 ‰	0,92 ‰
5,15 ‰	1,18 ‰	1,19 ‰
5,70 ‰	0,87 ‰	0,89 ‰
5,94 ‰	0,928 ‰	0,93 ‰

Hammarsten trat jedoch gegen die Bestimmung des Globulins mittelst Dialyse auf, indem er nachwie eine Bestimmung des Serumglobulins nach den älteren M zu geringe Werthe gebe, und dass eine zuverlässige Besti des Serumglobulins nur mittelst Ausfällung mit schwefl Magnesia möglich sei, und erhielt mit seiner neuen M die folgenden Ergebnisse:

Serumart.	Gesamt- eiweiss.	Serum- globulin.	Serum- albumin.	Serum Serum
Pferdeblutserum	72,57 ‰	45,65 ‰	26,92 ‰	0,3
Rinderblutserum	74,94 ‰	41,69 ‰	33,30 ‰	0,8
Hundeblutserum	58,20 ‰	20,50 ‰	37,70 ‰	1 1,

Es sind zwar gegen diese Angaben Hammarsten's wände erhoben worden, und zwar von Burkhardt²⁾

1) A. E. Burkhardt, Beiträge zur Chemie und Physiologi Blutserums. Archiv für experim. Pathologie und Pharmakologie, 1

2) l. c.

Heynsius¹⁾ in dem Sinne, dass das sich bei dem Hammarsten'schen Verfahren ergebende Mehr an Globulin durch Mitfällung von Albumin bedingt sei, wie wir weiter unten näher ausführen wollen. Es sind aber die Hammarsten'schen Angaben umsomehr als feststehend angesehen worden, als Pohl²⁾ mit einer neuen Methode der Globulinfällung in der Form der halben Sättigung mit schwefelsaurem Ammon gleiche Werthe wie Hammarsten erhielt.

Die Fällung mittelst Sättigung durch schwefelsaure Magnesia, ebenso wie die Fällung durch Halbsättigung mit schwefelsaurem Ammon gelten auch heutzutage als die überall übliche Methode der Globulinbestimmung im Serum.

Man sollte also entsprechend der vorhin citirten Charakteristik der Globuline mittelst dieser Salzfällungen einen Eiweisskörper erhalten, der, durch Dialyse von Salzen befreit, im Wasser unlöslich sein müsste.

Gelegentlich von Versuchen zur Reindarstellung von Albumin und Globulin aus Serum hat sich im hiesigen Laboratorium gezeigt, dass die Anschauungen, dass man mittelst dieser Methoden jenen Körper zur Abscheidung bringe, welchem ursprünglich der Name Globulin gegeben wurde, unzutreffend sind.

Die ersten diesbezüglichen Wahrnehmungen ergaben sich bei der Dialyse einer grösseren Menge durch halbe Sättigung mit schwefelsaurem Ammon unlöslich gemachten und von Albumin abfiltrirten Serumglobulins. Auch nachdem durch wochenlange Dialyse sowohl Sulfat- als Ammonreaction verschwunden war, fand sich nur eine relativ geringe Menge eines Eiweisskörpers unlöslich geworden, die über dem zu Boden gesunkenen Globulin stehende Flüssigkeit hingegen war sehr eiweissreich.

Auf Anregung Dr. Freund's habe ich unternommen.

1) A. Heynsius, Ueber das Verhalten der Eiweissstoffe zu den Alkalien und alkalischen Erden. Pflüger's Archiv, Bd. 34.

2) Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 20, S. 426.

diesen Widerspruch mit den bisherigen Angaben klarzustellen.

Die naheliegende Vermuthung, dass es sich um beigemengtes Albumin handle, musste fallen gelassen werden, weil diese Eiweisslösung durch Aussalzen mit Magnesiumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur wie durch Versetzen mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Lösung von schwefelsaurem Ammon vollkommen gefällt wird, also nach den Ansichten Hammarsten's und Pohl's lediglich aus Globulin bestand.

Begreiflicher Weise habe ich zunächst nachgesehen, ob nicht irgend ein fehlerhaftes Vorgehen vorliege.

Es musste also zunächst untersucht werden, ob die Lösung salzfrei wäre und nicht vielleicht andere Lösungsmittel des Globulins, insbesondere verdünnte Säuren und Alkalien, vorhanden wären. Abgesehen davon, dass die Reactionen auf Chloride, Sulfate, Kalk und Magnesia negativ ausfielen, hat sich in einer Portion, die unter besonderen Cautelen verascht wurde, ein ganz minimaler Aschengehalt gefunden (0,1% Asche berechnet auf Trockensubstanz). Die Löslichkeit dieses Körpers konnte also durch Anwesenheit von Salzen nicht bedingt gewesen sein.

Der Einfluss etwa vorhandener Säure oder Alkalis wurde dadurch eliminirt, dass Proben des löslichen Globulins mit Spuren von Säuren oder Alkali versetzt wurden.

Weder beim Durchleiten von Kohlensäure noch bei vorsichtigem Zusatz weniger Tropfen von $\frac{1}{100}$ -Normalsäure oder -Lauge traten Trübungen auf.

Auch die Einengung des Körpers in vacuo bei 40° brachte keine Trübung hervor. Ja der zur Trockne eingedampfte Körper liess sich in Wasser leicht lösen.

Wiewohl hierdurch allein schon die Möglichkeit ausgeschlossen war, dass unser Eiweisskörper durch irgend welche Fäulnissvorgänge löslich geworden wäre, haben wir eigens den Versuch angestellt, eine derartige Globulinlösung einer geringen Fäulniss auszusetzen.

Gerade aber bei dieser Probe zeigte es sich, dass eine Spur Alkalialbuminat entstanden war, welche durch Säure ausfiel.

Ich stand also bei dieser Beobachtung vor der Tatsache, dass der Körper, welcher durch schwefelsaures Ammon in halber Sättigung gefällt worden war und demnach nur Globulin repräsentiren sollte, ein Körper war, dem zum allergrössten Theil das wichtigste Kriterium des Globulins — die Unlöslichkeit in Wasser — fehlte.

Zur Aufklärung des in dieser Beobachtung gelegenen Widerspruches scheint es zweckmässig zu sein, die Gründe anzuführen, welche Hammarsten gelegentlich seiner Arbeiten über die Bestimmung des Globulins mittelst Aussalzens mit Magnesiumsulfat als Beleg für die Richtigkeit seiner Methode angab.

So hat Hammarsten schon in der ersten der citirten Arbeiten angeführt, dass der durch Magnesiumsulfat erhaltene Niederschlag durch Lösen in Wasser und Zusatz von Salz bis zu $\frac{4}{5}$ bezw. vollen Concentration sich in zwei Fractionen vom identischen Coagulationspunkt zerlegen lässt. Auch Kauder¹⁾ konnte später durch fractionirte Fällung mit Ammoniumsulfat zu keinerlei Verschiedenheiten im Coagulationspunkt kommen.

Im Uebrigen findet sich in der ersten Arbeit Hammarsten's nur der Hinweis darauf, dass dem Magnesiumsulfatniederschlag kein Albumin beigemischt ist. Hammarsten war sich zwar bewusst, dass bei diesem Verfahren mehr gefällt werde als durch Dialyse, zumal er ja einen Versuch angestellt hatte, wobei er erst nach Entfernung des Globulins durch mehrtägige Dialyse in der Lösung, welche auch durch Einleitung von Kohlensäure und Zusatz verdünnter Essigsäure nicht mehr getrübt wurde, mit Magnesiumsulfat eine starke Fällung erhielt. Hammarsten hat sich nun dieses Vorkommniss damit erklärt, dass im Serum noch unbekannte Körper vorhanden seien, welche die Lösung eines Theiles des Globulins vermittelten. Allerdings hat Hammarsten einen Versuch, den gewonnenen Niederschlag darauf zu prüfen, ob derselbe nach seiner Ab-

¹⁾ G. Kauder, Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmacol. Bd. 20, S. 411.

scheidung die wichtigste Eigenschaft des Globulins zeige, nämlich in Wasser unlöslich zu werden, damals nicht unternommen.

Erst als Burkhardt¹⁾ gegen die Hammarsten'sche Bestimmung den Einwand erhob, dass die nach Entfernung des durch Dialyse erhaltenen Niederschlages mit Magnesiumsulfat entstehende Fällung bei neuerlicher Dialyse in Lösung bleibe, da trat Hammarsten einen näheren Beweis für seine Behauptung an, dass der durch Magnesiumsulfat unlöslich werdende Körper seiner Gesamtheit nach Globulin sei.

Dieser Beweis stützt sich auf Versuche nach zwei Richtungen. Einerseits erbrachte Hammarsten den Nachweis, dass Globulin überhaupt nicht ganz unlöslich in Wasser sei, indem reines Globulin, gewonnen durch Dialyse eines Serums, wenn man es in Kochsalz auflöst und neuerlich dialysirt, nicht ganz zur Ausscheidung kommt, so dass Mengen von etwa 0,1% der Substanz in Lösung bleiben. Andererseits führt er Versuche an, welche zeigen sollten, dass, wenn man den fraglichen Globulinniederschlag einem Reinigungsverfahren unterzieht — solche waren die Wiederfällung mit Magnesiumsulfat und Kochsalz —, doch ein Theil dieses Körpers unlöslich wird.

Während nun die Versuche der Wiederfällung mit Magnesiumsulfat nur hier und da ein Unlöslichwerden des Niederschlages zur Folge hatten, gelang es Hammarsten, durch nachfolgendes Verfahren einen Theil des in Wasser löslichen Körpers unlöslich zu machen. Hammarsten dialysirte Serum, filtrirte den Niederschlag ab und schied im Filtrat den Rest des Globulins mit Magnesiumsulfat aus, löste den erhaltenen Niederschlag in Wasser und fällte neuerdings mit Magnesiumsulfat, löste wieder und erzeugte nach Entfernung des Magnesiumsulfates durch Dialyse nun mit Kochsalz eine Fällung, die gelöst und der Dialyse unterzogen wurde.

Trotzdem jetzt nur geringe Mengen von Eiweiss unlöslich wurden, hielt Hammarsten den Beweis für erbracht, dass alles

1) l. c.

löslich gebliebene Globulin auf solche Art unlöslich gemacht werden könnte.

Das Gelöstbleiben eines Theiles der Globuline bei der ersten Dialyse bezog er, wie erwähnt, auf Verunreinigung mit noch unbekannten Substanzen des Serums.

Als dritten Grund für die Globulinnatur des fraglichen Körpers führte Hammarsten die gleiche spezifische Drehung der beiden Globulinsubstanzen an.

Ich habe nun entsprechend diesen Hammarsten'schen Angaben versucht, auch jenen Theil des Globulins, der bei meinen Versuchen bei der Dialyse in Lösung geblieben war, unlöslich zu machen. Dabei bin ich genau nach den Angaben Hammarsten's vorgegangen und habe gefunden, dass dieser Körper, wenn er auch durch Kochsalz und Magnesiumsulfat unlöslich gemacht war, beim Reinigungsverfahren sich wieder vollkommen in Wasser löste und bei der Dialyse in Lösung blieb oder doch höchstens Spuren von Globulin ausfielen, welche eine leichte Opalescenz bedingten, die in ihrer Menge absolut unbestimmbar war. Es widerspricht dies übrigens nicht den Hammarsten'schen Angaben, da es auch ihm nie gelungen ist, von dem Körper, der durch Magnesiumsulfat, aber nicht durch Dialyse gefällt wird, zu zeigen, dass seine gesammte Menge unlöslich wird, sondern seine diesbezüglichen Beobachtungen stets nur einen kleinen Theil desselben betreffen.

Nach Vornahme der Hammarsten'schen Reinigungsversuche blieb also der bei der Dialyse löslich gebliebene Theil des Globulins fast vollkommen in Wasser löslich.

Bei dem Leser der Arbeiten Hammarsten's und Burkhardt's macht sich aber die Ansicht geltend, dass es sich nur um kleine Mengen von Serumglobulin handle, welche der Charakteristik des Serumglobulins, in Wasser unlöslich zu sein, widersprechen, und es könnte daher scheinen, dass es ein müssiges Beginnen sei, auf die grössere oder geringere Löslichkeit einer so geringfügigen Eiweissmenge die Existenz eines neuen chemischen Individuums aufbauen zu wollen.

Gerade aber die grossen Mengen des bei der Dialyse in

Lösung bleibenden Theiles des Globulins waren das A in den Eingangs geschilderten Versuchen.

Mit Rücksicht darauf habe ich, nachdem die Resultate der Beobachtungen an verschiedenen Serumproben festgestellt war, mein Hauptaugenmerk auf die quantitative Bestimmung des in Wasser löslichen und unlöslichen Theiles des Globulins gewendet.

Die Versuche wurden zunächst an Pferdeserum, das durch Defibriniren und Trennen der Blutkörperchen durch Centrifugation gewonnen war, angestellt.

200 ccm. dieses Serums, dessen Stickstoffgehalt 7,778 g¹⁾ Eiweissprocent enthielt, wurde in fließendes Wasser dialysirt, solange noch ein Niederschlag ausfiel. Es nahm dies gewöhnlich ca. 8 Tage in Anspruch. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, in stickstofffreier Natronlauge in Lösung gebracht und kjeldahlisch bestimmt. Es ergaben sich 0,046 % Stickstoff. Das Filtrat A von dem Niederschlage musste noch den zwar nicht durch Dialyse, aber durch Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat fällbaren Antheil enthalten.

Es wurde nun ein Theil des Filtrates A mit gepulvertem Magnesiumsulfat bis zur Concentration und noch mit derselben Menge einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat versetzt, der Niederschlag abfiltrirt und mit concentrirter Magnesiumsulfatlösung gewaschen.

1) Hier, wie auch später wurde, soweit dies nicht besonders gehoben ist, der Eiweissgehalt aus dem Stickstoffgehalt durch Multiplication mit dem Factor 6,25 berechnet.

2) Dieser Vorgang wurde beobachtet, weil es sich zeigte, dass trotz dem oft eine Globulinlösung mit Magnesiumsulfat soweit gelöst war, dass dieses beim Stehen wieder auskrystallisirte, von Neuem gefügte Magnesiumsulfatlösung eine neue Fällung hervorrief. Vgl. Hoppe-Seyler's Hdb. der phys. u. path.-chem. Analyse, der 1. Aufl. angibt: «Zur Bestimmung der Globuline getrennt von Albumin fügt man zu 20—50 ccm. der serösen Flüssigkeit die gleiche bis doppelte Menge gesättigter wässriger Lösung von Magnesiumsulfat, erwärmt, auf 40° C. und trägt gepulvertes Magnesiumsulfat in die Mischung ein, bis bei dieser Temperatur nichts mehr davon gelöst wird . . .» u. s. w.

Da im Magnesiumsulfat sich Spuren von Ammoniak nachweisen liessen (mit Nessler's Reagens), wurde coagulirt, das Coagulat ammoniakfrei gewaschen und kjeldahlisirt.

Für 100 ccm. Serum fanden sich dann in dem nur durch Magnesiumsulfat, nicht durch Dialyse fällbaren Antheil 0,507ⁿ Stickstoff.

Ein zweiter Theil des Filtrates A wurde mit Ammoniumsulfat bis auf 30% gesättigt, wobei nach Pohl das Albumin noch nicht fällt, es wurde sodann mit halbgesättigter Lösung gewaschen, hierauf wieder coagulirt, das Coagulat von jeglichem Ammoniak durch andauerndes Waschen mit heissem Wasser befreit. Dieser Antheil ergab 0,533% Stickstoff, bezw. 0,481%,¹⁾ also im Mittel 0,507% des Gesamtstickstoffes des Serums.

Die Globulinfällung mit schwefelsaurer Magnesia gibt somit ungefähr den gleichen Werth wie die mit schwefelsaurem Ammon. Betrachtet man in diesem Falle das Verhältniss des in Wasser löslichen zu dem in Wasser unlöslichen Globulin, so findet man dasselbe: 0,507:0,045; also sind nur 9% des Globulins unlöslich geworden.

In einem andern Pferdeserum, das auf andere Weise (durch Gerinnung) gewonnen war und einem anderen Thier entstammte, fanden sich 0,089% Stickstoff als unlöslich gewordenes, 0,423% als in Lösung gebliebenes Globulin. Also beträgt hier der unlösliche Antheil 21% des löslichen.

Es scheint also nach den eben angeführten Versuchen, als ob die Menge des löslichen und unlöslichen Globulins im Serum schwanke. Ob dies bloss individuelle Abweichungen sind, oder ob vielleicht die Gewinnungsweise einen gewissen Einfluss hat, bleibt dabei unentschieden. Nur dies sei noch angeführt, dass ich bei einem dritten Versuche das Verhältniss

1) Die zweite erhaltene Zahl sieht nämlich von dem kleinen Antheil des mit Ammoniumsulfat erhaltenen Globulinniederschlages ab, der sich nicht ganz in Lösung bringen lässt und dessen weitere Eigenschaften wir noch zu untersuchen gedenken. Jedenfalls ist er gegen Säuren und Laugen äusserst resistent.

4,29 : 0,87 fand, wonach der unlösliche Antheil des Globulins etwa 20,3% des löslichen beträgt, eine Zahl, die mit der im zweiten Versuch gefundenen annähernd übereinstimmt, was, da hier dieselbe Gewinnungsweise des Serums wie im vorhergehenden Versuche stattfand, für den oben erwähnten Einfluss der Bereitungsweise sprechen würde.

Auch im Plasma wurden quantitative Untersuchungen angestellt und haben zu ähnlichem Ergebniss geführt. Dabei wurden hier die Versuche in 2 Kontrollproben durchgeführt.

Je 90 ccm. Pferdeblut wurde in je 10 ccm. einer Lösung von $\frac{1}{10}$ % oxalsaurem Natron aufgefangen und sodann centrifugirt. Der nach Kjeldahl bestimmte Stickstoffgehalt dieses abgeheberten Oxalatplasmas betrug 1,020 g auf 100 ccm.

Der bei der Dialyse dieses Plasmas ausfallende Niederschlag enthielt 0,114% Stickstoff, in dem andern Falle 0,123%.

Im Filtrate wurden durch Versetzen mit gleicher Menge Ammoniumsulfatlösung Niederschläge gefällt, die gewaschen, gelöst, coagulirt und NH_3 -frei gewaschen wurden, bis mit Nessler's Reagens keine Reaction nachweisbar war. Im ersten Falle wurde ein Niederschlag von 0,560%, im zweiten Falle von 0,535% Stickstoff gefunden. Rechnet man noch das im Wasser lösliche zu dem in Wasser unlöslichen, so erhält man 0,674 g Stickstoff im ersten, 0,658 g Stickstoff im zweiten Falle (berechnet für 100 ccm. des Oxalatplasmas). Das unlösliche Globulin beträgt in dem einen Falle 20,4%, in dem andern 23,1% des in Wasser löslichen.

In der nun folgenden Tabelle stellen wir die bei den quantitativen Bestimmungen erhaltenen Zahlen nochmals übersichtlich zusammen. Die Angaben beziehen sich, wo dies nicht ausdrücklich hervorgehoben ist, auf die mit der Kjeldahl'schen Methode gefundenen Stickstoffwerthe, die mit Ausnahme der Reihe VIII in Procenten des angewandten Materials berechnet sind.

Tabelle der quantitativen Bestimmungen.

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.
Art des Materials	Gewonnen durch	Stickstoffgehalt des Serums	Globulin durch Dialyse unlöslich	Globulin durch Dialyse nicht, aber durch Magn.-Sulf. fällbar	Globulin durch Dialyse aber durch Am.-Sulf. fällbar	Gesamt-globulin	In Wasser unlösliches Globulin in % des löslichen
Pferdeserum	Centrifugiren	1,244 % (entspr. 7,778 g Eiweiss)	0,046 %	0,507 %	0,533 % resp. 0,481 % Mittel 0,507 %	0,553 %	9 %
Pferdeserum	Gerinnung	—	0,089 %	—	0,423 %	0,512 %	21 %
Pferdeserum	Gerinnung	—	0,087 %	—	0,429 %	0,516 %	20,3 %
Oxalatplasma	10 ccm. $\frac{1}{10}$ oxals. Na-Lösung. 90 ccm. Plasma (Centrifugiren)	1,020 % ¹⁾	0,114 %	—	0,560 %	0,674 %	20,4 %
Oxalatplasma	10 ccm. $\frac{1}{10}$ oxals. Na-Lösung. 90 ccm. Plasma (Centrifugiren)	1,020 % ¹⁾	0,123 %	—	0,535 %	0,658 %	23 %

Es ergibt sich also aus diesen Untersuchungen ein bedeutendes Ueberwiegen des in Wasser löslichen Antheils des Globulins über den in Wasser unlöslichen, indem man durch Magnesiumsulfat oder halbe Sättigung mit Ammoniumsulfat im Serum einen Niederschlag bekommt, von dem nur etwa 9—23 % der allgemeinen Charakteristik der Globuline entsprechen.

Wir finden eine Bestätigung dieser auffallenden Thatsache in den zu Anfang citirten Globulinbestimmungen Hammarsten's. Doch hat Hammarsten diese Differenzen nicht in einer charakteristischen Eigenschaft begründet gesehen, sondern sie auf die Mangelhaftigkeit der alten Methode bezogen. Ich habe nun die Eigenschaften dieses Globulinantheiles, der in Wasser löslich

¹⁾ Des Oxalatplasmas (entsprechen $1,0206 \times \frac{10}{9} = 1,134$ % des ursprünglichen Plasmas).

ist, näher untersucht und dabei festgestellt, dass er sehr deutliche Xanthoprotein-, Biuret- und Schwefelreaction (Bleiacetat und Kali) ergibt, dass ferner die Adamkiewicz'sche Reaction positiv und ebenso die Molisch'sche Reaction im Coagulat positiv ausfällt. Der Körper gibt also alle Farbenreactionen der Eiweisskörper deutlich.

Zur Bestimmung des Coagulationspunktes suchte ich mir ein Produkt von besonderer Reinheit nach folgendem Verfahren darzustellen. Blutserum wurde mit Ammoniumsulfat gefällt in einer Concentration, wobei nur Globulin ausfällt (30 g Salz auf 100 ccm. Serum), der hierbei entstehende Niederschlag abfiltrirt, möglichst vom Filtrate getrennt und nun auf dem Filter gelöst. Hierauf wurde die Fällung wiederholt, jedoch mit so wenig Salz, dass das Filtrat noch sehr eiweissreich war, sodass eine Mitausfällung des Albumins ganz ausgeschlossen war. Endlich wurde noch ein drittes Mal in derselben Weise vorgegangen. Der letzte Niederschlag wurde abfiltrirt, gelöst und nun gegen destillirtes Wasser, das etwas mit Chloroform zur Verhütung der Fäulniss geschüttelt war, vier Monate lang dialysirt, bis sowohl Aussenwasser als Inhalt der während der Dialyse fest verschlossenen Schläuche keine Schwefelsäure- und Ammoniakreaction mehr gaben.

Bei diesem Versuche war das destillirte Wasser täglich gewechselt worden, im Ganzen also etwa 120 mal.

Ueber dem bei der Dialyse unlöslich gewordenen Niederschlag stand nach dieser Zeit wieder eine grosse Menge einer sehr eiweissreichen Flüssigkeit, die nun zunächst, weil schwach alkalisch, neutralisirt wurde. Hierbei entstand, was wir an dieser Stelle nochmals besonders hervorheben, kaum eine leichte Trübung, sodass Alkaliwirkung das Globulin nicht in Lösung gehalten haben konnte, was übrigens angesichts der grossen Eiweissmengen, die in Lösung waren, schon an und für sich unwahrscheinlich war.

Von dieser so dargestellten Lösung des Eiweisskörpers, die eine gelbe, klare Flüssigkeit vom specifischen Gewicht 1,0096 darstellte, wurde ein Theil ohne Salzzusatz coagulirt, der andere aber in 0,6% NaCl, weil mir letztere Methode zugleich ein

Mittel gab, ihn mit dem in Wasser unlöslichen Globulin zu vergleichen. Im Nachfolgenden stelle ich nun das **Ergebniss** der Versuche zusammen.

Coagulationspunkte.

A.

Das in Wasser lösliche Globulin ohne Salzzusatz.

Temperatur	Art der Trübung
46°	leichte Trübung
bis 51°	stetige Zunahme, filtrirt.
65°	flockige Fällung, filtrirt.
70—72°	II. flockige Fällung, filtrirt.
80°	III. flockige Fällung, filtrirt.
über 80°	nur leichte Opalescenz.

B.

Die Eiweisskörper des Serums in 0,6%iger Kochsalzlösung.

Name des Körpers	Temperatur	Art der Fällung
Albumin	49,2°	leichte Trübung.
	62,2—65°	flockige Fällung.
In Wasser unlösliches Globulin	64—65°	erste Opalescenz.
	70—73°	Flocken.
In Wasser lösliches Globulin	56°	leichte Trübung.
	60°	Opalescenz.
	69—72°	Flocken.

Demnach beginnt unser Körper etwas früher zu coaguliren, verhält sich aber sonst fast wie das in Wasser unlösliche Globulin.

Die Bestimmung der specifischen Drehung wurde an einer Lösung vorgenommen, die nach übereinstimmenden Ergebnissen der Trockenbestimmung und Stickstoffbestimmung einen Gehalt von 1,256% Eiweiss aufwies. Zur Circumpolarisation bediente ich mich hierbei des Apparates von Schmidt und Hänsch, bei welchem der Nonius Hundertstelgrade ablesen lässt. Es wurde Natriumlicht verwendet. Der Mittelwerth einer Reihe von Ablesungen im 1 dm-Rohr betrug 0,608, entsprechend $(\alpha)_D^{20} = -48^\circ$; der Mittelwerth im 2 dm-Rohr 1,224, entsprechend $(\alpha)_D^{20} = -48,9^\circ$; der Mittelwerth einer mit gleicher Menge 10% iger Kochsalzlösung verdünnten Substanzmenge 0,31, entsprechend $(\alpha)_D^{20} = -49^\circ$.

Endlich hatte ich bei einer Lösung eines andern in Wasser löslichen Globulins $(\alpha)_D^{20} = -48,0^\circ$ gefunden. Fredericq gibt als Mittel für die Drehungsconstante des unlöslichen Globulins $(\alpha)_D^{20} = -47,8^\circ$ an, ein Werth, der dem von mir gefundenen sehr nahe steht.

Die Elementaranalyse ergab:

1.	0,1841 g	Substanz	ergaben	0,3568 g	CO ₂	und	0,1139 g	H ₂ O.
2.	0,38875 g	"	"	0,7528 g	CO ₂	und	0,0107 g	H ₂ O.
somit in	%	I		II				Mittelwerthe
	C	52,85 %		52,815 %				52,83 %
	H	6,86 %		6,9 %				6,88 %
		N nach Kjeldahl = 15,90 %						
		S und O { 24,39 %						

Diese gefundenen Werthe stimmen mit den von Hammarsten für das unlösliche Globulin gefundenen Werthen überein.

Nach den chemischen Reactionen, der Coagulationstemperatur, der elementaren Zusammensetzung und der specifischen Drehung ist ein Unterschied des löslichen von dem in Wasser unlöslichen Globulin nicht zu erkennen. Das unterscheidende Merkmal ist nämlich einzig und allein die Löslichkeit dieses Körpers in Wasser, die demselben ganz charakteristisch anhaftet, ob er kurz oder lang dialysirt wird, ob man ihn mit Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat gefällt hat, ob man mit Kohlensäure oder Essigsäure ansäuert, ebenso charakteristisch

als die Unlöslichkeit in Wasser für jene kleine Menge von Eiweiss, welche man durch Dialyse aus dem Serum unlöslich machen kann und die immer wieder unlöslich wird, ob man sie in Kochsalz gelöst hat oder in schwefelsaurer Magnesia, sobald man ihr diese Salze durch Dialyse entzieht.

Die Annahme Hammarsten's, dass diese Löslichkeit auf der Beimengung unbekannter Substanzen beruhe, die einen Theil des in Wasser unlöslichen Globulins in Lösung erhalten, kann wohl nur für Spuren geltend gemacht werden, auf die sich seine Versuche beziehen, ist aber nicht ausreichend zu erklären, dass mindestens $\frac{3}{5}$ — $\frac{4}{5}$, ja sogar $\frac{9}{10}$ einer Substanz gelöst sind, während nur der kleine Rest ungelöst bleibt.

Die thatsächlichen Verhältnisse stehen also so, dass wir eine Charakteristik für Globulin besitzen, die besagt: Globuline sind in Wasser unlöslich. Dieser Charakteristik entsprechen nur Zehnteltheile jenes Körpers, den man als Globulin betrachtet. Andererseits haben wir Methoden der Globulindarstellung, die uns eine Substanz liefern, welche zu $\frac{8}{10}$ — $\frac{9}{10}$ nicht diesem Charakter entspricht. Wir stehen also vor der Alternative, entweder den Globulinen die Wasserunlöslichkeit als charakteristische Eigenschaft abzuerkennen oder den grösseren Theil der bis jetzt zu den Globulinen gerechneten Körper als eine neue Gruppe der Eiweisskörper anzusprechen.

Nach dem Princip «de potiori fit denominatio» möchte ich vorschlagen, die Fällbarkeit mit schwefelsaurer Magnesia und durch halbe Sättigung mit schwefelsaurem Ammon als charakteristisch für Globulin zu betrachten, daher den durch diese Reagentien fällbaren Körpern den Namen Globulin zu belassen, aber die Wasserunlöslichkeit nicht mehr als Charakteristikon der Globuline anzusehen, sondern einen in Wasser löslichen Theil des Serumglobulins anzuerkennen.

Dass sich bisher eine Scheidung dieser Körper durch fractionirte Fällung mit Salzen (Hammarsten, Kauder) nicht hat durchführen lassen, kann wohl nicht als Grund gegen eine auf die Wasserlöslichkeit hin vorzunehmende, also auf ein physikalisches Verhalten gegründete Trennung angesehen werden.

Es könnte scheinen, als ob die Aufstellung dieser Unterabtheilung ein mehr systematisches als thatsächliches Interesse habe.

Es freut mich darum schon, jetzt auf eine Thatsache verweisen zu können, welche den Beweis liefert, dass diese Trennung des löslichen von dem unlöslichen Globulin auch eine Scheidung von biologisch verschieden wirksamen Substanzen bedeutet.

Wie gleichzeitig mit dieser Arbeit im hiesigen Laboratorium vorgenommene Untersuchungen ergeben haben,¹⁾ lassen sich sowohl die Albumine als die in Wasser unlöslichen Globuline dem Heilserum entziehen, ohne dass an ihnen ein Heilwerth haften bliebe, während die in Wasser lösliche Globulinsubstanz als die Trägerin der Heilwirkung erscheint.

Ist diese Thatsache auch der Pathologie entnommen, so wird es wohl auch keinem ernststen Widerspruch begegnen, wenn wir daraus die Berechtigung nehmen, auch im physiologischen Serum diese Substanzen nominell von einander zu trennen.

1) Dr. W. Seng, Koch und Flügge, Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. XXXI. «Ueber die qualit. u. quant. Verh. der Eiweisskörper im Diphtherieheilserum.»

Ueber die rothbraunen Farbstoffe bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans.

Von
Eyvín Wang.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität zu Kristiania).

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1899.)

In einer früheren Mittheilung¹⁾ habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass andere Harnbestandtheile als Indigoblau aus dem Harn mit Chloroform extrahirt werden, weshalb ich eine Reinigung des Rückstandes nach dem Abdestilliren des Chloroforms vorgeschlagen habe.

Eine solche Befreiung des Chloroformresiduums von fremden Beimengungen war schon von Obermayer²⁾ in Anwendung gebracht, indem er die rothbraunen Farbstoffe, welche sich neben Indigoblau bilden, mit 45 %igem Alkohol entfernte. Diese Farbstoffe werden von Obermayer als Oxydationsprodukte des Indoxyls aufgefasst.³⁾ Trotzdem hat er es angezeigt gefunden, dieselben zu entfernen, weil neben diesen Farbstoffen auch andere Harnbestandtheile in das Chloroformextract übergehen, welche Kaliumpermanganat reduciren.

Um das Chloroformextract zu reinigen, habe ich eine Mischung von gleichen Volumtheilen Aether, Alkohol (96 %) und Wasser benutzt und dabei eine wässrige Lösung von Indigosulfosäure erhalten, welche reine blaue Indigofarbe hat. Diese Flüssigkeit ist aber nicht von fremden Körpern voll-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, 1899, S. 135.

²⁾ Wiener klin. Rundschau 1898, Nr. 34, S. 537.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVI, 1898, S. 427.

ständig befreit und ist deshalb erst nach Filtriren zur Titration geeignet. Vergleichende Versuche haben mir gezeigt, dass colorimetrische und titrimetrische Bestimmungen des Indigoblaus nach diesem Verfahren übereinstimmende Resultate liefern.

Neulich ist Bouma¹⁾ zu dem Resultat gekommen, dass die Reinigung des Chloroformextractes nicht nur überflüssig, sondern ganz unrichtig sei, und dass man die besten Resultate mit meiner ursprünglichen Methode²⁾ erhalte. Die Reinigung wird von Bouma als eine «sogenannte» bezeichnet, weil die rothbraunen Farbstoffe, welche entfernt werden, nicht etwa von Skatoxyl herkommen, sondern Oxydationsprodukte des Indoxyls seien. «Es ist bis jetzt aber kein Mittel gefunden worden, das gestattet, die Oxydation des Indoxyls so verlaufen zu lassen, dass Blau, Braun und Roth in bestimmtem Verhältniss zu einander gebildet werden» — — — — «Die Waschungsverfahren würden nur dann brauchbare Resultate liefern, wenn das Mengenverhältniss der auftretenden Modificationen immer constant wäre.»

Dass die rothbraunen Farbstoffe zu der Indigogruppe gehören, habe ich für nicht wahrscheinlich gehalten.³⁾ Sie sind nämlich in Aetheralkoholwasser sehr leicht löslich, während Indigoroth in Alkohol und Aether sehr schwer und Indigobraun in Alkohol sehr wenig löslich ist.

Für die Bildung dieser Farbstoffe stellt Bouma die Hypothese auf, dass sich Roth und Braun bei «Depolymerisation» des Indigoblaus bilden, indem letzteres das grösste Indigomolekül darstelle. Für Polymerie führt Bouma die Beobachtung an, dass reines Indigoblau beim Kochen der Chloroformlösung desselben theilweise in Indigoroth umgebildet werde. Selbst habe ich reines, nach Fritzsche's Methode⁴⁾ dargestelltes Indigotin stundenlang mit Chloroform am Rückflusskühler ge-

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVII., 1899, S. 348.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXV., 1898, S. 406.

3) Diese Zeitschr. Bd. XXVII., 1899, S. 138.

4) Gerhardt, Lehrbuch d. organ. Chemie 1855, Bd. 3, S. 567.

kocht, ohne irgend welche Aenderung der blauen Farbe wahrnehmen zu können; ebenso habe ich Indigoblau aus dem Harn, nachdem der Chloroformrückstand mit Aetheralkoholwasser gereinigt war, in derselben Weise mit Chloroform gekocht und habe auch in diesem Falle keine Bildung weder von Indigoroth noch Braun beobachten können.

Die Resultate Bouma's dürfen sich wahrscheinlich darauf beziehen, dass er mit unreiner Substanz gearbeitet hat. Das von ihm angewendete Kochen des käuflichen Indigos mit verdünnter Schwefelsäure ist zur Darstellung von reinem Indigotin kaum geeignet. Diese Substanz wird aber bekanntlich durch Oxydation von Indigoweiss sehr leicht in reinen Krystallen erhalten.

Das Chloroformextract des Harnindigos zeigt aber nicht nur öfters — wie Bouma bemerkt —, sondern fast ohne Ausnahme beim Abdestilliren des Chloroforms eine Aenderung der Farbe von Blau oder Blauviolett bis nahezu Burgunderroth. Diese Farbenänderung kann aber einer «Depolymerisation» nicht zugeschrieben werden.

Durch einen einfachen Versuch wird man sich davon überzeugen können, dass die Erwärmung beim Kochen oder Abdestilliren des Chloroforms keine Bildung von Indigoroth verursacht.

Mit drei gleichen Portionen habe ich Parallelversuche gemacht und zwar in der Weise, dass das Chloroform in der ersten Portion im Vacuum bei Zimmertemperatur abgedampft, in der zweiten wie gewöhnlich auf dem Wasserbade abdestillirt und in der dritten vor dem Abdestilliren die Lösung eine Stunde lang im Kolben mit Rückflusskühler gekocht wurde.

Der Rückstand besass bei sämmtlichen Portionen das gleiche Aussehen. Nach dem Entfernen der rothbraunen Antheile durch Waschen mit Aetheralkoholwasser und nachheriges Filtriren der wässerigen Lösung von Indigosulfosäure erhielt ich bei der Titration mit Kaliumpermanganat folgende Werthe:

I. 1,43 mg; II. 1,40 mg; III. 1,38 mg.

Man sieht also, dass weder die Destillation noch das langdauernde Kochen der Chloroformlösung die Resultate be-

einflusst. Die Rothfärbung während des Abdestillirens oder des Kochens kann somit nicht auf «Depolymerisation» und Bildung von Indigoroth beruhen, sondern muss fremden Farbstoffen zugeschrieben werden.

Von Skatoxyloth kann wohl nicht die Rede sein, da dieser Farbstoff sich ja nicht mit Chloroform extrahiren lässt.

Wenn die Hypothese Bouma's richtig wäre, könnte man sich auch kaum denken, dass Parallelanalysen, nach der Waschungsmethode ausgeführt, übereinstimmende Resultate liefern könnten. Die inconstante Bildung der verschiedenen Indigomodificationen, von welchen zwei (Roth und Braun) entfernt werden, würden nothwendiger Weise dazu führen, dass verschiedene Quantitäten Indigoblau als Rest für die titrimetrische Bestimmung übrig blieben.

Durch zahlreiche Parallelversuche habe ich mich doch immer überzeugen können, dass die gefundenen Indigowerthe ausserordentlich gut übereinstimmen, sowohl wenn die Analysen mit gleich grossen Portionen, als auch wenn sie mit wechselnden Quantitäten desselben Harns ausgeführt wurden. Zur Illustration werden folgende Analysen dienen können:

Etwa 2 Liter Harn wurden mit Bleizucker gefällt und in 8 Portionen des Filtrates zu je 100 ccm. die Indigomenge nach dem Waschen mit Aetheralkoholwasser und Filtriren der wässerigen Lösung von Indigosulfosäure bestimmt. Es wurden 0,96 — 0,90 — 1,04 — 0,90 — 0,89 — 0,93 — 0,96 und 0,90 mg Indigo gefunden.

Von demselben Harnfiltrat wurde

in 250 ccm.	2,3 mg Indigo gefunden	=	0,92 mg per 100 ccm.
» 200 »	1,86 » » »	=	0,98 » » 100 »
» 100 »	0,95 » » »	=	0,95 » » 100 »
» 50 »	0,45 » » »	=	0,90 » » 100 »

Demnach scheint doch die Bildung von Indigoblau ziemlich constant zu sein.

Die Experimente Bouma's, nach welchen verschiedene Quantitäten Indigoblau erhalten werden, je nachdem die Oxydation des Indoxyls bei niedriger oder höherer Temperatur verläuft, lässt sich wohl auch anders als durch «Depolymerisation»

erklären. Ich habe immer gefunden, dass die Resultate bei Titration des Indigos auch bei Zimmertemperatur variiren können, je nachdem man die Mischung von Harn im Salzsäureeisenchlorid vor dem Chloroformausschütteln längere oder kürzere Zeit stehen lässt. Die Extraction mit Chloroform habe ich immer gleich nach dem Zusatz von Salzsäureeisenchlorid vorgenommen, während Obermayer empfiehlt, dieselbe erst nach einem Zeitraum von 15 Minuten anzufangen.

Vergleichende Versuche haben mir indessen gezeigt, dass es angezeigt ist, sogleich mit Chloroform zu extrahiren, sonst wird man immer, wie aus Folgendem hervorgehen wird, zu niedrige Indigowerthe erhalten:

Harnportionen à 250 ccm.					
	a)	b)	c)	d)	e)
	Sogleich	mit Chloroform extrahirt:	1,95 mg Indigo		
	b)	"	"	"	1,88
	c)	Nach $\frac{1}{4}$ Stunde	"	"	1,50
	d)	" $\frac{1}{2}$	"	"	1,43
	e)	" 1	"	"	1,13
	f)	" 2	"	"	1,13

In obenstehender Versuchsreihe habe ich das Residuum mit Aetheralkoholwasser ausgewaschen. Es wäre somit — nach Bouma — möglich, dass der Verlust an Indigoblau durch Bildung der «modificirten» durch das Waschen entfernten Farbstoffe bedingt wäre. Dies ist aber nicht der Fall, denn Parallelbestimmungen, nach meiner ursprünglichen Methode (ohne Waschen) ausgeführt, geben vollständig analoge Resultate. Es scheint also sichergestellt zu sein, dass das Stehen der Harnsalzsäuremischung durch kürzere oder längere Zeit vor der Chloroformextraction einen Verlust an Indigo bedingt.

Dieser Verlust darf entweder auf eine bei der langdauernden Einwirkung weiter als bis zum Indigoblau gehende Oxydation des Indoxyls bezogen oder dadurch erklärt werden, dass sich das Indigotin beim Stehen krystallinisch ausscheidet und in diesem Zustande nur sehr schwer in dem Chloroform aufgenommen wird.

Bouma hat die niedrigste Indigomenge gefunden, wenn die Oxydation bei etwa 0° verläuft. Bei dieser Temperatur nimmt er eine langsame Oxydation an und lässt längere Zeit

im Eis stehen. Der Rückstand zeigt sich dann auf der weissen Porzellanschale rothviolett und die in der Schale zurückbleibende Menge reines Indigoblau war etwa die Hälfte kleiner als wie aus gleichen Harnmengen, wenn die Oxydation bei Zimmertemperatur sowie bei etwa 45° verlief. In diesen beiden letzten Fällen hat er aber die Extraction sogleich oder jedenfalls schon 10—15 Minuten nach dem Zusatz von Salzsäure angefangen.

Bouma gibt ferner nicht an, in welcher Weise er kontrollirt hat, dass er wirklich die ganze Indoxylmenge als Indigofarbstoffe erhalten hat, sagt nur, dass der Rückstand in der ersten Portion rothviolett war, während derselbe sich bei den zwei übrigen Bestimmungen «blau mit rothbraunem Belag» und «fast rein blau mit sehr geringer Rothfärbung» zeigte. Aus diesem Verhältniss scheint Bouma den Schluss zu ziehen, dass die fehlende Menge Indigoblau als eine rothe Modification vorhanden sei.

Dass die Farbe der rothen oder rothbraunen Beimengungen bei einem Mindergehalt von Blau stärker hervortritt, scheint mir aber sehr natürlich zu sein. Dies mag jedenfalls kaum mehr beweisen, als dass die fremden Farbstoffe relativ in reichlicher Menge vorhanden sind, sagt aber über deren absolute Menge nichts aus.

Um den Einfluss der verschiedenen Temperaturen bei der Oxydation des Indoxyls nachzuprüfen, habe ich Parallelbestimmungen mit gleichen Portionen Harnfiltrat ausgeführt. Einerseits wurden Harn und Salzsäureeisenchlorid von etwa 20° gemischt, wobei die Temperatur bis 37° emporstieg. Andererseits wurden Harn und Salzsäureeisenchlorid vor der Mischung bis zu 0° abgekühlt; die Temperatur stieg diesmal nur zu 15°. In beiden Fällen wurde sogleich mit Chloroform extrahirt und die gefundenen Indigomengen waren gleich (bei 37° 0,87 mg und bei 15° 0,83 mg).

Die spektroskopischen Untersuchungen Bouma's habe ich noch nicht nachprüfen können, da es mir nicht gelungen ist, aus Pflanzenindigo und Harnindican einheitliche rothbraune Farbstoffe zu erhalten. Durch Kochen des käuflichen Madras-

und Bengalindigos mit verdünnter Schwefelsäure und Auswaschen des Rückstandes mit Wasser erhielt ich ein Indigo, welches mit Chloroform in Kolben mit Rückflusskühler gekocht, zuerst eine blaue und dann eine blauviolette Farbe zeigte. Die Lösung, in einer Schale verdunstet, lieferte aber nur einen blaugefärbten Rückstand mit röthlichem Kupferglanz und keine rothbraunen Farbstoffe, wie sie sich beim Abdampfen des Chloroformextractes von Harnindigo zeigen.

Der Chloroformrückstand des käuflichen Indigos lieferte mit Aether behandelt eine stark purpurrothe Lösung; mit Alkohol liess sich aber kein kaffeebrauner Farbstoff ausziehen. Der Rückstand des Harnindigos, mit Aether behandelt, liefert aber keine purpurrothe Lösung, sondern eine schwach röthlichgelbe Flüssigkeit, die sich in allen Concentrationen anders als die obengenannte purpurrothe Lösung verhält. Mit Alkohol habe ich, wie Bouma, aus dem Rückstand des Harnindigos auch eine kaffeebraune Lösung erhalten, die aber bei Anwendung von 96%igem kalten Alkohol gar nicht frei von Indigoblau ist.

Gegen die Annahme, dass es sich um «Depolymerisation des Indigoblau» oder Entstehung verschiedener Modificationen der Indigofarbstoffe handelt, spricht ganz bestimmt die That- sache, dass die Nahrung sowohl auf die Bildung der roth- braunen Farbstoffe wie auf andere fremde Bestandtheile, welche störend auf die Titrirung einwirken, einen bedeutenden Einfluss hat. Dieses geht unzweideutig aus meinen Fütterungs- versuchen mit Hunden ¹⁾ hervor: Einige Tage, nachdem die Thiere eine Nahrung bekamen, welche hauptsächlich aus Fleisch bestand, zeigte sich die Reinigung mit Aetheralkoholwasser für die nach meiner ursprünglichen Methode gefundenen Indigo- werthe von geringer Bedeutung, weil die Menge der roth- braunen Farbstoffe durch Fleischnahrung erheblich verringert wurde. Selbstversuche haben mir ebenfalls gezeigt, dass reine Fleischnahrung eine bedeutende Verminderung sowohl der roth- braunen Farbstoffe wie anderer fremder Bestandtheile bewirkt.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, 1899, S. 573.

Hiernach scheint es nicht möglich, dass die rothbraunen Antheile verschiedene Modificationen des Indigos darstellen, und die Bildung von Indigoroth und Braun neben Indigoblau scheint mir noch zweifelhaft zu sein. Bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans nach der von mir angegebenen Methode wird man sie jedenfalls nicht in Betracht nehmen können. Ausser diesen Farbstoffen gehen nämlich andere Harnbestandtheile in das Chloroformextract über, welche mit Schwefelsäure Verbindungen eingehen, die reducirend auf Kaliumpermanganat einwirken und deshalb nothwendiger Weise entfernt werden müssen. In dieser Beziehung wäre erstens Hippursäure zu erwähnen, welche von concentrirter Salzsäure in Benzoesäure und Glycocoll gespalten wird. Die im Chloroform aufgenommene Benzoesäure bildet aber mit concentrirter Schwefelsäure eine Sulfosäure, die löslich im Wasser ist und Chamäleonlösung reducirt. Ferner kommt Phenol in jedem Harn als phenolschwefelsaures Kalium vor und wird durch die concentrirte Salzsäure zerlegt, und Phenol geht in das Chloroformextract über. In gleicher Weise verhalten sich wahrscheinlich aromatische Oxysäuren. Es sind somit in jedem Harn viele Verbindungen vorhanden, welche störend auf die Indigotitrirung einwirken, wenn sie nicht durch eine Waschmethode von dem Chlorformrückstand entfernt werden.

Dass die vielfach erwähnten braunen Farbstoffe der Indigogruppe nicht angehörig sind, glaube ich wahrscheinlich gemacht zu haben; dass sie es wenigstens theilweise nicht sind, lässt sich durch die Lösungsverhältnisse direkt beweisen, denn schon kaltes Wasser zieht aus dem Chloroformrückstand einen gelben, warmes Wasser dazu noch einen braunen Farbstoff aus. Die Indigofarbstoffe sind aber in Wasser unlöslich.

Auch ungefärbte, die Titrirung störende Verbindungen machen, wie ich schon früher gezeigt habe, eine Reinigung nothwendig. Nach der Beseitigung der rothbraunen Antheile des Rückstandes mit 45^o/o igem Alkohol habe ich durch Waschen mit Aetheralkoholwasser noch farblose, durch Kaliumpermanganat oxydirbare Verbindungen entfernen können. — Schliess-

lich habe ich darauf aufmerksam gemacht, dass die vollständige Befreiung des Rückstandes von fremden Beimengungen auch durch dieses Waschungsmittel noch nicht erreicht wird, indem man übereinstimmende Resultate bei colorimetrischen und titrimetrischen Bestimmungen erst dann erhält, wenn die wässerige Lösung der Indigosulfosäure filtrirt wird.

Ich komme nach Allem, was ich oben dargelegt habe, zu dem Resultat, dass die Reinigung des Chloroformrückstandes bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans richtig und nothwendig ist.

Kristiania, 12. September 1899.

Ueber Benzoylirung der Hexonbasen.

Von

Dr. D. Lawrow.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg a. L.)

(Der Redaction zugegangen am 29. September 1899.)

Die Fähigkeit des Lysins¹⁾ und Arginins,²⁾ Benzoylverbindungen zu liefern, kann für die Isolirung und Charakterisirung der Hexonbasen von grosser Bedeutung werden. Ich habe nun mehrere Versuche gemacht, die fraglichen Verbindungen aus Arginin- und Lysinpräparaten darzustellen, die ich durch Zersetzung des Histons von Leucocyten der Thymusdrüse bekommen hatte. Diese Versuche ergaben, dass die ungereinigten Benzoylverbindungen vom Lysin wie vom Arginin in Aether bei Gegenwart von ganz kleinen Salzsäuremengen, die beim Freiwerden der Benzoessäure schwer zu vermeiden sind, leicht löslich sind, während sie sich unter denselben Bedingungen in Petroläther schwer lösen. Dies erinnert an eine Angabe von E. Klebs,³⁾ nach welcher das Benzoylderivat der Diamidopropionsäure in reinem Zustande von Aether fast gar nicht aufgenommen wird, während das mit Benzoessäure noch verunreinigte Präparat in Aether leicht löslich ist.

Im Allgemeinen eignet sich nach meinen Versuchen das folgende Verfahren am besten zur Darstellung:

Man führt die Benzoylirung nach der Schotten-Baumann'schen Methode aus, indem man einen grossen Ueberschuss

1) Drechsel, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 28, S. 3189—3190.

2) W. Gulewitsch, Diese Zeitschrift. Bd. XXVII, S. 178—215.

3) E. Klebs, Diese Zeitschrift. Bd. XIX, S. 301—338.

von Benzoylchlorid anwendet und eine stärkere Erhitzung der Lösung vermeidet. Der erhaltenen abgekühlten und in ein grosses Becherglas filtrirten Lösung wird zuerst ein 4—5faches Volumen von Petroläther, dann 10%ige Salzsäure hinzugefügt, solange noch ein Niederschlag oder eine Trübung entsteht. Nach jedem Ansäuern rührt man die Mischung sorgfältig mit einem Glasstab um. Von dem erhaltenen, sehr klebrigen Niederschlage wird dann sowohl die Petroläther-, als die wässerige Lösung vorsichtig abgessogen, was ohne Verlust leicht möglich ist. Darauf zerreibt man den Niederschlag in demselben Becherglase einige Male mit Petroläther, giesst denselben ab, bringt dann 150—200 ccm. Wasser hinein und setzt das Gefäss einige Minuten in ein kochendes Wasserbad. Jetzt gelingt es leicht, die geschmolzene Substanz mit Hülfe eines mit einer Gummikappe versehenen Glasstäbchens von dem Boden und den Wänden des Gefässes zu einem Klumpen zu sammeln und in ein kleines Becherglas zu bringen. Hier wird die Substanz zuerst mit heissem Wasser, dann mit Aether ausgezogen. (Die wässerigen Auszüge reagiren gewöhnlich sehr schwach sauer.) Ueber Schwefelsäure im Vacuumexsiccator getrocknet, nimmt die Masse ein theilweise krystallinisches Aussehen an, durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser erhält man mikroskopisch kleine, gut ausgebildete Nadeln. Bei dem zuletzt angestellten normal verlaufenden Versuche, in dem ich 2,0 g Lysincarbonat, gelöst in 200 ccm. 10%iger Natronlauge, zweimal mit Benzoylchlorid — und zwar jedesmal mit 25 ccm. — behandelte, betrug die Ausbeute an Benzoylprodukt nach der Extraction mit Petroläther, heissem Wasser und Aether in der angegebenen Weise und nach dem Trocknen im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure bis zur Gewichtconstanz 3,84 g, also ungefähr 90% der theoretisch berechneten Ausbeute.

Ueber den Einfluss des Theins auf die Ausscheidung von Alkalien im Harn. (I. Mittheilung.)

Von

K. Katsuyama

unter Mitwirkung der Herren **T. Kuwahara** und **K. Seno.**

(Aus dem physiol. Laboratorium der III. Hochschule zu Okayama.)

(Der Redaction zugegangen am 3. Oktober 1899.)

Die Zunahme der Harnsecretion kann bekanntlich durch chemisch sehr verschiedenartige Substanzen, wie Thein, Theobromin, Harnstoff, Kochsalz und Salpeter etc., bewirkt werden. Dass bei der vermehrten Diurese — gleichgültig, durch welches Mittel sie hervorgerufen wird — stets eine Abnahme der saueren Harnreaction bis zum Uebergang in eine neutrale oder alkalische stattfindet, hat Rüdel¹⁾ sowohl bei Kaninchen wie bei Hunden mit Sicherheit nachgewiesen. Da die Harnreaction mit den Harnbestandtheilen in Zusammenhang steht, und da die Ursache der erwähnten Reactionsänderung wohl in der Hervorrufung der Diurese zu suchen ist, so liegt auf der Hand, dass die harntreibenden Mittel einen wesentlichen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung des Harns ausüben müssen. Wir finden in der Litteratur eine Angabe von Thomas,²⁾ die diesen Gegenstand betrifft; sie lautet nämlich: «Gewissen Diureticis (Kochsalz, Salpeter, Coffein) kommt nach Munk und Senator die Fähigkeit zu, die specifischen

1) Rüdel, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmac. Bd. 30, S. 48.

2) Thomas, Anleit. z. qual. u. quant. Anal. d. Harns. 26. Abtheil. Wiesbaden, 1890, S. 208.

Nierenepithelien zu erhöhter Thätigkeit anzuregen. Zuweilen ist dieselbe sogar ungewöhnlich stark. Unter diesen Verhältnissen nimmt die Secretion der specifischen Harnbestandtheile und damit zugleich die des Wassers ausserordentlich zu, die letztere sogar noch weit mehr als die der festen Bestandtheile, während die Grösse der Transsudation nur um soviel ansteigt, als der Blutgeschwindigkeit entspricht, welche meist nur wenig und vorübergehend vermehrt ist. > Aus dieser Angabe geht leider nicht hervor, ob alle specifischen Harnbestandtheile im gleichen Grade vermehrt sind oder ob die Zunahme des einen Bestandtheils die des anderen übertrifft. Es erscheint uns sehr wünschenswerth, in dieser Richtung sämmtliche Diuretica einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. Wir theilen zunächst die Untersuchung mit, die in der Absicht ausgeführt wurde, einen Aufschluss über den Einfluss des Theins auf die Ausscheidung der Alkalien zu gewinnen.

Die Einwirkung des Theins auf den Stoffwechsel war seit einer Reihe von Jahren der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Die Beobachtungen, die verschiedene Autoren dabei gemacht haben, waren durchaus nicht einstimmig. nämlich einige gaben als Folge des Theins eine Verminderung der Harnstoffausgabe an, während die anderen dem Thee resp. dem Thein eine steigernde Wirkung auf die Harnstoffausscheidung zuschrieben. Diese widersprechenden Resultate können wohl dadurch bedingt sein, dass die Untersuchungsbedingungen keineswegs vorwurfsfrei waren.

Hoppe-Seyler¹⁾ war der erste, der die Wirkung des Theins auf den Stoffwechsel unter Rücksichtnahme auf die nöthigen Cautelen untersucht hat. Er gab einem Hunde täglich die gleiche Menge von Milch und Fleisch ohne und mit Zusatz von Coffein und erhielt in der ganzen Reihe (von 19 Tagen) ein allmähliches Absinken der Harnstoffausscheidung. Da nun aber diese Verminderung der Harnstoffausscheidung sehr unbedeutend ist, so schliesst Hoppe-Seyler daraus, dass das

1) Hoppe-Seyler, *Physiol. Chemie*, 1881, S. 958; in *Deutsch. Klinik*. 1857, Nr. 19.

Coffein nicht eine entschiedene Einwirkung auf die Stickstoffausscheidung beim Hunde zeigt.

Voit¹⁾ untersuchte den Eiweissverbrauch bei einem Hunde während verschiedenartiger Ernährungsweise und Einführung einer gewöhnlichen Quantität von Kaffeeabsud. Er konnte in keinem Falle eine Aenderung der Harnstoffausscheidung nachweisen.

Endlich möchten wir erwähnen, dass es Jacoby²⁾ gelang, die Glycosurie hervorzurufen, wenn er bei gut ernährten Kaninchen durch Einführung von Coffeinsulfosäure die vermehrte Diurese hervorrief.

Wir gehen nun zu unseren eigenen Untersuchungen über.

Als Versuchsthiere benutzten wir ausschliesslich Kaninchen. Da es nicht möglich ist, das Kaninchen gleichmässig mit einer bestimmten Quantität Futter zu ernähren und während des Versuchs auf dem Stoffwechselgleichgewicht zu erhalten, so entzogen wir ihm so lange die Nahrung, bis die Alkaliausscheidung im Harn beinahe constant wurde. Sobald dieser Punkt erreicht war, gaben wir dem Thier 0,2 g Thein und setzten die Beobachtung einige Tage weiter fort. Behufs Auffangens des Harns brachten wir während des Versuchs das Thier in einen Käfig, dessen Boden mit Zinkblech so beschlagen ist, dass der entleerte Harn in einem untergestellten Gefässe sich sammeln musste. Zur Abgrenzung der Tagesmenge wurde dem Thier alle 24 Stunden der Harn aus der Blase ausgepresst.

Was die Bestimmung der Alkalien anbetrifft, so verfahren wir genau nach der Vorschrift von Katsuyama.³⁾

1. Versuch.

Einem 2485 g schweren Kaninchen wurde vom 21. Februar 1898 1 Uhr Nachmittags ab die Nahrung entzogen. Am 24. Februar 1 Uhr Nachmittags bekam das Thier 0,2 g Thein in 30 ccm. Wasser gelöst in den Magen eingespritzt. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

1) Voit, Hermann's Handb. d. Physiol. Bd. 6, S. 174.

2) Jacoby, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmac. Bd. 35, S. 213.

3) Katsuyama, Diese Zeitschrift. Bd. XXVI, S. 543.

Tabelle 1.

Hunger- tag	Körper- gewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Bemerkungen
1.	2382	55	schwach alkal.	1,030	0,4565	Theintag
2.	2307	40	sauer	1,039	0,4751	
3.	2252	36	„	1,039	0,4968	
4.	2190	52	„	1,034	1,7608	
5.	2120	23	„	1,039	0,3148	

2. Versuch.

Vom 2. März 1898 1 Uhr 15 Min. Nachm. ab wurde ein kräftiges Kaninchen von 2457 g Körpergewicht auf absolute Carenz gesetzt. Am 5. März 1 Uhr 30 Min. Nachm. wurden 0,2 g Thein in 30 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen eingespritzt. Beinahe 24 Stunden nach Darreichung von Thein ging das Thier zu Grunde. Die Versuchsergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2.

Hunger- tag	Körper- gewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Bemerkungen
1.	2365	46	neutral	1,035	0,4538	Theintag.
2.	2285	40	sauer	1,036	0,4188	
3.	2218	41	„	1,036	0,3922	
4.	2140	71	„	1,026	1,0905	

In den oben geschilderten Versuchen (1. und 2.) war die Trennung des Kaliums vom Natrium wegen der Verunreinigung des benutzten Platinchlorids misslungen. Es lässt sich jedoch nicht verkennen, dass nach Eingabe von Thein die Ausscheidung der Harnalkalien gewaltig gesteigert war.

3. Versuch.

Einem 1998 g schweren Kaninchen wurde vom 13. März 1898 12 Uhr 30 Min. Nachm. ab die Nahrung entzogen. Am 16. März 1 Uhr Nachm. erhielt das Thier 0,2 g Thein in 30 ccm. Wasser gelöst in den Magen eingespritzt. Das Weitere zeigt die Tabelle.

Tabelle 3.

Hunger-tag	Körper-gewicht g	Harn-menge ccm.	Re-action	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor-alkalien berechnet g	K ₂ O g	Na ₂ O g	Bemerkungen
1.	1782	90	neutral	1,015	—	—	—	
2.	1715	55	sauer	1,029	0,6947	0,4046	0,0281	
3.	1647	37	„	1,038	0,6762	0,3237	0,0863	
4.	1557	80	„	1,021	1,1573	0,3278	0,3378	Theintag.
5.	1497	42	„	1,038	0,2852	0,1620	0,0149	

Es ist sehr beachtenswerth, dass am Theintage das Natrium eine bedeutende Zunahme erfuhr, während die Vermehrung des Kaliums keine nennenswerthe war.

4. Versuch.

Ein kräftiges Kaninchen von 1925 g Körpergewicht wurde vom 3. April 1898 1 Uhr Nachm. ab der absoluten Carenz unterworfen. Am 6. April wurden 0,2 g Thein in 30 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen injicirt. Das Weitere zeigt die Tabelle.

Tabelle 4.

Hunger-tag	Körper-gewicht g	Harn-menge ccm.	Re-action	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor-alkalien berechnet g	K ₂ O g	Na ₂ O g	Bemerkungen
1.	1804	81	alkalisch	1,010	0,4933	0,2443	0,0561	
2.	1745	35	sauer	1,036	0,6124	0,3700	0,0136	
3.	1690	34	„	1,040	0,7733	0,4390	0,0409	
4.	1522	128	alkalisch	1,009	2,0266	0,6906	0,4937	Theintag.
5.	1492	24	sauer	—	0,9646	0,5856	0,1912	

Aus diesem Versuche ergibt sich, dass das Thein eine bedeutende Steigerung der Harnalkalien, besonders des Natriums, bewirkt. Die Veränderung der Harnreaction, die bei Darreichung von Thein zu Stande kam, kann wohl auf die vermehrte Diuresis zurückgeführt werden.

5. Versuch.

Vom 22. April 1898 2 Uhr 10 Min. Nachm. ab wurde ein Kaninchen von 2195 g Körpergewicht auf die absolute Carenz gesetzt. Am 26. April 2 Uhr 40 Min. Nachm. erhielt das Thier 0,2 g Thein in 30 ccm. Wasser gelöst in den Magen injicirt. Das Weitere ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 5.

Hunger-tag	Körper-gewicht g	Harn-menge ccm.	Re-action	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor-alkalien berechnet g	K ₂ O g	Na ₂ O g	Bemerkungen
1.	2035	103	schw.sauer	1,017	0,7051	0,4054	0,0330	
2.	1920	45	sauer	1,040	0,6649	0,4140	0,0045	
3.	1832	39	„	1,042	0,5343	0,2831	0,0447	
4.	1710	98	„	1,021	1,3554	0,2918	0,4730	Theintag.
5.	1637	28	„	1,042	0,4618	0,1995	0,0772	

Wie aus der Tabelle hervorgeht, erfuhr die Menge des Natriums am Theintage eine bedeutende Zunahme, während die Vermehrung des Kaliums sich weniger bemerkbar machte.

Die geschilderten 5 Versuche zeigen übereinstimmend, dass bei Darreichung von Thein eine deutliche Zunahme der Alkalien, besonders des Natriums, im Harne vom hungernden Kaninchen sichtbar wird. Somit ist mit Sicherheit erwiesen, dass das Thein nicht allein die Steigerung der Harnsecretion verursacht, sondern auch einen wesentlichen Einfluss auf die Harnbestandtheile, wenigstens beim hungernden Kaninchen, ausübt.

Fragen wir uns nun, wovon diese vermehrten Harnalkalien herrühren, so müssen wir zunächst die Erklärung dafür darin suchen, dass in Folge der Coffeindiurese eine Ausspülung der im Körper aufgespeicherten Alkalien stattfindet. Es ist jedoch keineswegs ausgeschlossen, dass die Mehrausscheidung der Alkalien im Harn theilweise auf die reichliche Bildung derselben durch den verstärkten Zerfall der Körpersubstanz bezogen wird. Wenn diese Erklärungen auch zutreffend wären, wird man doch den Einwand zulassen müssen, dass die Zunahme der Alkaliausscheidung nicht durch das Thein selbst hervorgerufen wird, vielmehr der Wirkung des zur Auflösung des Theins benutzten Wassers zuzuschreiben ist, denn es ist ja eine bekannte Thatsache, dass bei hungernden Thieren¹⁾ die Wasserzufuhr stets eine gesteigerte N-Ausscheidung zur Folge hat. Um diesen Einwand zu entkräften, haben wir folgende Versuche angestellt.

6. Versuch.

Vom 13. Juli 1898 2 Uhr 10 Minuten Nachmittags ab wurde einem Kaninchen von 2021 g Körpergewicht die Nahrung entzogen. Am 16. Juli, 2 Uhr 10 Minuten Nachmittags, wurden 30 ccm. Wasser²⁾ dem Thiere in den Magen eingeführt. Das Weitere zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 6.

Hunger- tage	Körper- gewicht g	Harn- menge ccm.	Re- action	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	K ₂ O g	Na ₂ O g	Bemerkungen
1.	1890	58	alkalisch	1,021	0,4072	0,2566	0,0001	
2.	1832	35	sauer	1,032	0,3525	0,2136	0,0072	
3.	1767	33	„	1,035	0,2744	0,1715	0,0013	
4.	1741	30	„	1,038	0,2974	0,1522	0,0297	30 ccm. H ₂ O eingegeben
5.	1682	25	„	—	0,2866	0,1375	0,0363	

1) J. Munk, Weyl's Handb. d. Hyg. Jena, 1893, Bd. III, S. 16.

2) Die Quantität, die zur Auflösung von 0,2 g Thein benutzt wurde.

Vom 18. Juli 1898 2 Uhr Nachmittags ab wurde ein 3372 g schweres Kaninchen auf absolute Carenz gesetzt. Am 21. Juli, 2 Uhr Nachmittags, wurden 30 ccm. Wasser dem Thiere in den Magen eingespritzt. Das Weitere ist in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 7.

Hungertage	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gew.	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	K ₂ O g	Na ₂ O g	Bemerkungen
1.	3213	67	alkalisch	1,017	0,5161	0,2807	0,0376	
2.	3117	50	sauer	1,024	0,6144	0,3722	0,0128	
3.	3035	36	„	1,032	0,4350	0,2674	0,0058	
4.	2984	37	„	1,032	0,4500	0,2779	0,0050	30 ccm. H ₂ O
5.	2920	25	„	—	0,4177	0,2352	0,0236	eingegeben

Wie wir nunmehr aus den obigen Tabellen entnehmen können, zeigt sich nach Eingabe von 30 ccm. Wasser kein Einfluss sowohl auf die Harnmenge als auf die Alkaliausscheidung. Es lässt sich aber nicht leugnen, dass im 6. Versuche gerade am Tage, wo das Wasser eingegeben wurde, eine geringe Zunahme des Natriums stattfand. Dies darf uns jedoch nicht Wunder nehmen, denn Katsuyama¹⁾ hat bereits den Nachweis erbracht, dass der Harn von einem zuerst mit Tofukara gefütterten und dann auf die absolute Carenz gesetzten Kaninchen vom 1. bis 7. Hungertage reicher an Natrium wird. Es unterliegt keinem Zweifel, dass das Thein mit gesteigerter Diurese eine bedeutende Vermehrung der Harnalkalien hervorzubringen im Stande ist.

Dass die Zufuhr der grösseren Quantität Wasser nicht gleichgültig für die Alkaliausscheidung ist, braucht man nicht hervorzuheben.

Okayama, den 20. August 1899.

1) Diese Zeitschrift, B. XXVI, S. 543.

Cystin, ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz.

Von
K. A. H. Mörner.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium des Karolinischen Instituts in Stockholm.)

(Der Redaction zugegangen am 7. Oktober 1899.)

Die Frage über die Bindungsart des Schwefels in den Proteinstoffen ist zwar mehrmals Gegenstand der Bearbeitung gewesen, aber mit nur wenig entscheidenden Resultaten. Aus Untersuchungen, welche in Liebig's Laboratorium ausgeführt wurden, weiss man, dass die Behandlung mit Lauge nur einen Theil des Schwefels als Schwefelalkali abspaltet, welches Bleioxyd schwärzt, und dass ein grosser Theil des Schwefels in Moleküle zurückbleibt. Man hat seitdem zwei verschiedene Bindungsformen des Schwefels angenommen und von oxydirtem und nicht oxydirtem resp. von fest gebundenem und locker gebundenem oder bleischwärendem Schwefel gesprochen, welcher in verschiedenen Proteinkörpern in verschiedener Menge vorkommt.

Die Art der Verkettung dieses locker gebundenen, bleischwärenden Schwefels ist durch die bisherigen Untersuchungen keineswegs aufgeklärt worden. Die Ansichten über die Bedeutung desselben gehen auch ziemlich weit auseinander.

Die Proteintheorie von Mulder betrachtete seiner Zeit den locker gebundenen Schwefel zwar nicht als einen Bestandtheil des Kernes der Proteinkörper, nahm aber an, dass er in einer Seitenkette gebunden sei, welche für die verschiedenen Eigenschaften der einzelnen Proteinkörper Bedeutung habe. Für

ziemlich bedeutungslos dagegen hält Danilewsky¹⁾ diesen Schwefel, da er angibt, dass derselbe mehr oder weniger vollständig entfernt werden kann, und dass das dabei entstehende Produkt ohne Einführung von Schwefel in den ursprünglichen Proteinkörper zurückgewandelt werden kann. Die Anschauung, dass der bleischwärende Schwefel für die Proteinkörper etwas Nebensächliches sei, scheint übrigens ziemlich verbreitet zu sein.

Auf Grund seiner Oxydationsversuche mit Kaliumpermanganat nimmt Maly²⁾ an, dass der Schwefel, von welchem er ein Atom im Eiweissmoleküle rechnet, in der Form einer SH-Gruppe vorkommt, welche durch Oxydation in einer Sulfonsäuregruppe übergeführt werden kann, indem das Molekül im Uebrigen nur wenig verändert wird.

Gegen diese Annahme macht A. Krüger³⁾ die Bemerkung, dass sie die verschiedene Abspaltbarkeit des Schwefels nicht berücksichtigt und dass die Thatsachen, auf welche sie gegründet ist, mehrdeutig sind. Bezüglich des locker gebundenen Schwefels hebt Krüger die schon von Fleitmann⁴⁾ erwähnte Aehnlichkeit desselben mit dem Schwefel des Cystins beim Kochen mit Lauge und Bleiacetat hervor.

Nach Suter⁵⁾ ist diese Uebereinstimmung jedoch nicht vollständig; nach ihm ist es nur ein kleiner Theil des locker gebundenen Schwefels, welcher sich wie Cystin verhält: der grössere Theil wird rascher abgespalten.

Die Frage, ob sich Cystin in den Proteinkörpern vorgebildet findet, bietet ein nicht unbedeutendes physiologisches Interesse dar und hat mehrmals die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt.

Als Muttersubstanz des Cystins, welches bei Cystinurie im

1) A. Danilewsky, Diese Zeitschrift, Bd. VII, 1883, S. 442.

2) Maly, Sitzungsber. d. Kaiserl. Akad. d. Wissensch. Wien, Bd. 91. 1885, II. Abth., S. 180.

3) A. Krüger, Arch. f. d. ges. Physiologie, Bd. 43, 1888, S. 244.

4) Fleitmann, Annalen d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 66, 1848, S. 380.

5) Suter, Diese Zeitschrift, Bd. XX. 1895, S. 572.

Harne auftritt, betrachtet man die Proteinstoffe. Ob aber das Cystin unmittelbar daraus abgespalten wird, ob es durch einen synthetischen Process gebildet wird, bleibt dabei unentschieden. Es liegt jedoch Wahrscheinlichkeit vor, dass ersteres der Fall ist. Die von Baumann¹⁾ gemeinschaftlich mit Preusse und Goldmann ausgeführten schönen Untersuchungen haben nämlich gezeigt, dass Cystin oder eine dem Cystin verwandte Substanz normal in geringer Menge im Harne vorkommt, und dass Cystin ein intermediäres Stoffwechselprodukt zu sein scheint, welches durch Einführung von halogensubstituirtem Benzol gebunden und vor weiterer Zersetzung geschützt werden kann. Im Organismus hat man je doch Cystin nur selten und zufällig wiedergefunden; die Bedingungen für sein Auftreten daselbst sind unbekannt.

Aus Rindernieren erhielt Cloëtta²⁾ in einem Falle sechsseitige Krystalltafeln, welche die Eigenschaften des Cystins zeigten. In der Leber eines Menschen hat Scherer³⁾ einen ähnlichen Fund gemacht. Bei der Bearbeitung von Pferdeleber erhielt Drechsel⁴⁾ sechsseitige Täfelchen, welche er durch Analyse als Cystin identificirte. In der Leber eines Delphins fand er gleichfalls Cystin.⁵⁾ Er schliesst sich der Meinung an, dass Cystin ein normales intermediäres Stoffwechselprodukt des Organismus ist.

Zufällig hat man einige Male bei hydrolytischer Spaltung von Proteinstoffen Cystin beobachtet. Bei der Digestion von Fibrin mit der Pankreasdrüse hat R. Külz⁶⁾ einmal Cystin wiedergefunden. Es bleibt jedoch dahingestellt, ob das Cystin ein zufälliger Bestandtheil der Pankreasdrüse oder des Fibrins war, oder ob es vorübergehend unter günstigen Bedingungen

1) Baumann und Preusse, Diese Zeitschrift, Bd. V, 1881, S. 309. — Baumann und Goldmann, Bd. XII, 1888, S. 254.

2) Cloëtta, Annalen d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 99, 1856, S. 299.

3) Scherer, Jahresber. ü. d. Fortsch. d. Chemie, 1857, S. 561.

4) Drechsel, Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., Bd. 15, 1891, S. 245.

5) Drechsel, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 33, 1896, S. 86.

6) Mitgeth. von E. Külz, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 27, 1891, S. 415.

durch Einwirkung von Pankreas auf Fibrin auftritt. Einen anderen zufälligen Fund von Cystin theilt Emmerling¹⁾ mit: in einem Tyrosinpräparat aus Hornspänen fand er Cystintäfelchen, deren Bildung aus dem Keratin er für wahrscheinlich hält.

Ausser bei diesen zufälligen Beobachtungen, wo die Bildung des Cystins keineswegs aufgeklärt ist, hat man meines Wissens nie Cystin unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Proteinstoffe gefunden, obgleich die Aufmerksamkeit mehrfach darauf gerichtet war. Besonders hat Suter²⁾ dem Vorkommen von Cystin unter den Spaltungsprodukten der Hornsubstanz bei Kochen mit Säuren nachgeforscht. Aus dem negativen Ergebniss aller Versuche, das Cystin oder dessen Reductionsprodukt, das Cystein, aus dem Gemisch der Spaltungsprodukte der Hornsubstanz herauszufinden, folgert er, dass Cystin in grösserer Menge kein direktes Spaltungsprodukt der Hornsubstanz sei; Spuren von Cystin betrachtet er jedoch nicht als ausgeschlossen. In einer Tyrosinmutterlauge, welche Schimmelwucherung zeigte, fand er eine Substanz, die dem Cystin verwandt ist, nämlich Thiomilchsäure. Da aber erneuerte Versuche, dieselbe darzustellen, erfolglos blieben, schliesst er, dass die Thiomilchsäure kein primäres Spaltungsprodukt des Keratins sei.

Schon seit langer Zeit habe ich beobachtet, dass man die Hornsubstanz durch Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure) lösen und die Lösung längere Zeit erhitzen kann, ohne dass eine nennenswerthe Menge von Schwefelwasserstoff entweicht. Bei fortgesetzten Untersuchungen gelang es mir, aus der Lösung eine nicht unbeträchtliche Menge Cystin darzustellen. In einer Mittheilung in der Akademie der Wissenschaften zu Stockholm habe ich am 8. März ds. Js. die Methode angegeben und die Analysen der bis dahin dargestellten Cystinpräparate erwähnt.³⁾

1) Emmerling, Chemiker-Zeitung. 1894. S. 1539.

2) Suter, Diese Zeitschrift. Bd. XX. 1895. S. 564.

3) Öfversigt af Kongl. Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar. 1899. Seite 167.

Der Weg, welchen ich bei Darstellung des Cystins befolgt habe, war in der Hauptsache folgender:

Reine, entfettete und mit schwacher Salzsäure ausgewaschene Hornspäne wurden in einem Kolben mit 25%iger Salzsäure, auf je 100 g der lufttrockenen Hornspäne 300 ccm. der Säure, übergossen und so viel Wasser zugesetzt, dass der Kolben dadurch beinahe gefüllt wurde. Das Wasservolumen war gewöhnlich etwa $\frac{2}{3}$ von dem der Säure. — Zusatz von Zinnchlorür wurde vermieden. — Der Kolben war mit einem Stöpsel versehen, durch welchen zwei Röhren gingen, eine zuleitende, welche in die Flüssigkeit tauchte, und eine ableitende, welche zu einer Lösung von Bleiacetat leitete. Der Kolben wurde dann über einem kochenden Wasserbade erhitzt. Da der Kolben nicht von dem kochenden Wasser umgeben war, stieg die Temperatur nur bis 90—95° C.

Die Erhitzung wurde ohne Unterbrechung eine Woche oder, in einigen Versuchen, zwei Wochen fortgesetzt. Die Hornsubstanz löste sich in etwa einem Tage, und nach einigen Tagen wurde die Biuretreaction nicht mehr erhalten.

Die Flüssigkeit wurde bald stark braunschwarz gefärbt. Während des Erhitzens fand kaum nennenswerthe Gasentwicklung statt. Eine geringfügige Menge von Schwefelwasserstoff ging in die Bleiacetatlösung über. Auch ein wenig Kohlendioxyd schien gebildet zu werden. In einigen Versuchen habe ich den Raum über der Flüssigkeit mit Wasserstoff oder Kohlendioxyd gefüllt, ohne dabei eine Aenderung der Resultate zu beobachten. Das Gas, welches von der Flüssigkeit abgeleitet wurde, hatte einen schwachen, aber sehr unangenehmen Geruch, vielleicht von Aethylsulfid herrührend, dessen Bildung bei der Zersetzung von Proteinstoffen Drechsel¹⁾ angegeben hat.

Nach einiger Zeit der Erhitzung wurden im Halse des Kolbens Krystalle wahrgenommen, welche aus freiem Schwefel bestanden. Die Menge derselben war gering; in einem Versuche, wo 500 g Hornsubstanz zwei Wochen mit der Säure erhitzt wurden, betrug sie höchstens ein Decigramm.

1) Drechsel, Centralbl. f. Physiologie. Bd. 10, 1896, S. 529.

Nach beendeter Erhitzung wurde die Flüssigkeit durch Asbest filtrirt. Der ungelöste schwarze Rückstand wurde nach Entwässern mit Schwefelkohlenstoff ausgezogen. In dem eben erwähnten Versuche wurden 0,2 g freier Schwefel erhalten. In zwei anderen Versuchen, wo die Erhitzung nur eine Woche dauerte, war die Menge ausgeschiedenen Schwefels geringer.

Die schwarzbraune Flüssigkeit wurde mit Thierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade bei möglichst niedrigem Drucke abdestillirt. Im Destillate habe ich eine schwerflüchtige Substanz gefunden, welche mit Jod und Lauge Jodoform gab: ich beabsichtige die Untersuchung derselben zu verfolgen.

Der Rückstand wurde ein oder zwei Mal mit Weingeist aufgenommen und in derselben Weise abdestillirt. Der halbfeste Rückstand war im Allgemeinen ziemlich dunkel geworden. Obgleich der grösste Theil der Salzsäure durch die Destillation entfernt war, enthielt er noch eine nicht unbeträchtliche Menge derselben. Bisweilen war der Salzsäuregehalt so gering, dass ein kleiner Theil des Cystins (mit anorganischer Substanz gemengt) beim Auflösen des Destillationsrückstandes in Weingeist ungelöst zurückblieb. Meistens war dies nicht der Fall.

Der Gang der Bearbeitung des Destillationsrückstandes auf Cystin war in der Hauptsache der folgende.¹⁾ Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und bei gewöhnlicher Temperatur mit Bleioxyd behandelt, bis die Reaction beinahe neutral wurde. Durch Zusatz von Weingeist wurden die Bleiverbindungen niedergeschlagen, dann das Ungelöste abgesaugt und mit etwas verdünntem Weingeiste gewaschen. Die Bleifällung wurde mit Oxalsäure im Ueberschuss digerirt, bis alle bleischwärende Substanz in Lösung gegangen war. Die Oxalsäurelösung wurde mit Ammoniak neutralisirt und abgedampft, oder lieber mit Calciumcarbonat bis zur neutralen Reaction behandelt und die Flüssigkeit nebst dem durch Erwärmen mit einer reichlichen

¹⁾ In den einzelnen Versuchen habe ich, je nach Umständen, etwas verschieden verfahren. In der Fortsetzung dieser Untersuchungen, womit ich jetzt beschäftigt bin, wird auch die Verbesserung der Darstellungsmethode berücksichtigt.

Menge Ammoniak bereiteten Extracte der Calciumoxalatfällung weiter bearbeitet.

Die Lösung wurde durch Destillation bei niedrigem Drucke eingengt, und dabei das gegenwärtige Ammoniak entfernt, wobei unreines Cystin und Tyrosin auskrystallisirten.¹⁾ Das noch nicht reine oder einheitliche Cystin tritt oft in Kugeln auf, welche Leucinkugeln ähnlich sind; bei erneuertem Ausscheiden aus der ammoniakalischen Lösung kann es in ausgebildeten Krystallen erhalten werden.

Die Scheidung von Cystin und Tyrosin habe ich durch fractionirte Krystallisation bewirkt. Zwar haben Cystin und Tyrosin eine ähnliche Löslichkeit in Wasser, Säuren und alkalischen Flüssigkeiten. Findet sich viel Tyrosin neben dem Cystin vor, so gelingt es indessen die Hauptmasse des Tyrosins abzuschcheiden, wenn die nicht zu verdünnte Lösung in Ammoniak im Vacuum abdestillirt wird, doch so, dass ein Theil des Ammoniaks zurückbleibt; das Cystin kann fast vollständig in der Lösung bleiben. Andererseits, wenn nur wenig Tyrosin dem Cystin untermengt ist, kann beim Arbeiten mit mehr verdünnten Lösungen in Ammoniak das Cystin rein auskrystallisiren bei Destillation im Vacuum oder bei vorsichtigem Zusatz von einer Säure (Salzsäure, Essigsäure).

Als Richtschnur diente die von Cystin bewirkte Schwärzung bei Erhitzen mit Lauge und Bleiacetat und das Verhalten gegen Millon's Reagens. Eine durch Kochen bereitete wässrige Tyrosinlösung gibt mit einigen Tropfen des Reagens keine Fällung; beim Kochen erhält man die bekannte Rothfärbung der Flüssigkeit und dann eine Trübung. Eine durch Kochen bereitete wässrige Cystinlösung gibt mit dem Reagens eine reichliche weisse Fällung, welche im Ueberschuss des Reagens schwer löslich ist; beim Kochen tritt keine Färbung auf.

Die erhaltenen Cystinfractionen wurden durch Um-

¹⁾ Wenn, wie es mir vorgekommen ist, Chlorcalcium in solcher Menge zugegen war, dass es die Krystallisation hinderte, wurde die Salzsäure durch Destilliren im Vacuum mit einem geringen Ueberschusse von Oxalsäure entfernt und dann die Oxalsäure beseitigt.

krystallisation gereinigt. Sie wurden deswegen in Wasser mit Ammoniak gelöst, wenn nöthig, mit Thierkohle entfärbt, und durch Abdestilliren des Ammoniaks bei niedrigem Drucke ward das Cystin krystallisirt. Das Cystin wurde mit Wasser gewaschen, mit Alkohol und Aether behandelt und getrocknet.

Unter Befolgung des jetzt beschriebenen Weges habe ich aus der Hornsubstanz Cystin rein darstellen können. Durch einen besonderen Versuch, wo die Hornsubstanz mit Ammoniak ausgezogen wurde, habe ich mich überzeugt, dass kein freies, präformirtes Cystin in derselben vorkam; übrigens war die zur Zersetzung benutzte Hornsubstanz mit schwacher Salzsäure behandelt und dann ausgewaschen. Die Menge des Cystins war nicht gering. Am ausgiebigsten war bisher ein Versuch, in dem 500 g lufttrockene Hornsubstanz (450 g der trockenen Substanz entsprechend) während zwei Wochen erhitzt wurden. Insgesamt erhielt ich dabei rund 11 g Cystin (dabei eingerechnet einige Decigramme, welche aus Cystein dargestellt wurden), welches rein oder fast rein war, d. h. beinahe $2\frac{1}{2}\%$ der trockenen Hornsubstanz.

Das Cystin war jedoch nicht immer das seit lange in Harnsteinen und im Harn bekannte linksdrehende Cystin, welches mit Vorliebe in sechsseitigen Täfelchen krystallisirt. Ausser diesem habe ich auch noch anderes Cystin gefunden. Daneben habe ich in einigen Versuchen etwas Cystein nachweisen können.

Ein Cystin, welches in typischen sechsseitigen Täfelchen krystallisirte und die starke Linksdrehung des Harncystins zeigte, habe ich nach Erhitzen der Hornsubstanz mit Salzsäure während einer Woche erhalten: aus 250 g lufttrockener Hornsubstanz (225 g trockener Substanz entsprechend) wurden rund 3 g dieses Cystins erhalten, was beinahe $1\frac{1}{2}\%$ der trockenen Substanz gibt (ausserdem wurde eine geringere Menge, etwa 1 g, in Nadeln krystallisirendes Cystin erhalten).

Die Krystalle dieses «linksdrehenden» Cystins waren in kaltem Wasser nur wenig löslich. In heissem Wasser lösten sie sich etwas reichlicher. Gegen Alkalien und Säuren verhielten sie sich so, wie es in der Litteratur für Cystin aus Harn angegeben wird. Die Lösung in 5—10%iger Natron-

lauge gab beim Erhitzen mit Bleiacetat eine reichliche Abscheidung von Schwefelblei. Durch Behandeln mit Zinn und Salzsäure wurde es zu Cystein reducirt und gab die Farbenreactionen desselben; durch Oxydation mit Jod konnte Cystin in der ursprünglichen Form wiedergewonnen werden.

Die durch Kochen mit Wasser bereitete Lösung verhielt sich gegen Lakmus neutral. Diese Lösung trübte sich nicht, selbst wenn sie mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehen blieb. Mit Merkurinitrat und mit Millon's Reagens gab sie eine voluminöse weisse Fällung. Wenn Millon's Reagens zur kochenden Flüssigkeit zugesetzt wurde, entstand eine ähnliche weisse Fällung; beim Kochen trat keine Färbung auf, auch nicht nach Zusatz von mehr Reagens. Quecksilberchlorid bewirkte bald eine Trübung und dann eine geringe körnigkrystallinische Fällung; durch Gegenwart von Salzsäure (1%) wurde die Bildung dieser Fällung verhindert. Zusatz von Zinkacetat bewirkte bald Trübung und binnen Kurzem setzte sich eine verhältnissmässig reichliche körnige, krystallinische Fällung ab. Chlorzink fällte weniger leicht als Zinkacetat. Kupferacetat, wie basisches Bleiacetat und Silbernitrat gaben geringe Fällungen.

Nicht getrübt wurde die Lösung durch Eisenchlorid, Zinnchlorür, Kupfersulfat, Merkuriacetat, Quecksilberjodid-Jodkalium (auch nach Zusatz von Salzsäure), Phosphorwolframsäure mit und ohne Salzsäure, Gerbsäure, Pikrinsäure. Nitroprussidalkali mit Natronlauge gab keine Färbung.

Die nähere Untersuchung dieses Cystins wird im Folgenden wiedergegeben.

Der Schwefel wurde unter üblichen Cautelen (Prüfung der Reagentien, Verbrennung über Weingeistflamme u. s. w.) durch Schmelzen mit Kaliumhydrat und Salpeter bestimmt. Der Stickstoff wurde theils volumetrisch, theils nach Kjeldahl-Wilfarth bestimmt. Die Bestimmung des Kohlenstoffs geschah durch Verbrennung im Platinschiffchen im Sauerstoff mit vorgelegtem Kupferoxyd, Bleichromat-Asbest und metallischem Kupfer.

Präparat I. Die Verbrennung von 0.0957 g der Substanz gab 8.64 ccm. Stickstoff (bei 0° C. und 760 mm. Hg), was 11,35% Stickstoff entspricht.

Aus 0,0756 g Substanz wurden 0,1456 g Baryumsulfat erhalten, entsprechend 26,60% Schwefel.

Präparat II wurde bei einem anderen Versuche dargestellt.

Die Verbrennung von 0,1303 g gab 12,08 ccm. Stickstoff (bei 0° C. und 760 mm. Hg), was 11,65% Stickstoff entspricht.

Aus 0,3142 g der Substanz wurden 0,6105 g Baryumsulfat erhalten. was 26,59% Schwefel entspricht.

Bei der Verbrennung von 0,3220 g wurden 0,3571 g Kohlendioxyd und 0,1479 g. Wasser gebildet, was 30,24% Kohlenstoff und 5,09% Wasserstoff entspricht.

Für die Löslichkeit im Wasser bei 17° C. ergab sich im Mittel aus zwei Versuchen das Verhältniss 1:9000.

Zur Bestimmung der optischen Activität wurden 0,9218 g in verdünnter Salzsäure zu 50 ccm. gelöst. Eine Schicht von 30 ccm. dieser Lösung drehte 12,415° nach links; dies gibt $[\alpha]_D = -224,3^\circ$. Nach einem Tage war die Drehung unverändert. Die optische Activität wurde also ein wenig grösser gefunden, als sie für das Cystin aus dem Harne angegeben wird.¹⁾

Präparat III wurde in demselben Versuche wie Präparat II erhalten.

Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Wilfarth gab für 0,1700 g der Substanz einen Verbrauch von 14,04 ccm. Zehntelnormalsäure, was 11,57% Stickstoff entspricht.

Die Schwefelbestimmung in 0,1891 g gab 0,3685 Baryumsulfat. entsprechend 26,77% Schwefel.

In der folgenden Tabelle werden diese Werthe mit den für Cystin berechneten zusammengestellt.

	Cystin berechnet	Präparat I	Präparat II	Präparat III
Schwefel	26,68 %	26,60 %	26,59 %	26,77 %
Stickstoff	11,69 %	11,35 %	11,65 %	11,57 %
Kohlenstoff	29,96 %		30,24 %	
Wasserstoff	5,04 %		5,09 %	
$[\alpha]_D$			- 224,3°	
Löslichkeit			1:9000	

¹⁾ Vergleiche die Zusammenstellung bei Huppert (zehnte Auflage der Anleitung zur Analyse des Harns von Neubauer und Vogel, 1898. S. 272). Für die 1%ige ammoniakalische Lösung bestimmte Külz $[\alpha]_D = -142^\circ$; für die 0,84 und 2,1%ige Lösung in starker Salzsäure fand Mauthner $[\alpha]_D = -205,9^\circ$; für die 2,13%ige Lösung in schwacher Salzsäure Baumann $[\alpha]_D = -214^\circ$.

Dass ein Cystin vorlag, ist nach diesen Thatsachen unzweifelhaft. Auf Grund der Krystallform und der Linksdrehung ist es als identisch mit dem einzigen bisher bekannten Cystin, nämlich dem aus Harn und Harnsteinen, zu betrachten.

Wenn die Hornsubstanz nur eine Woche mit der Salzsäure erhitzt wurde, erhielt ich ganz überwiegend das oben geschilderte stark linksdrehende Cystin. Nach zweiwöchentlichem Erhitzen erhielt ich in einem Versuche eine grössere Ausbeute an Cystin, aber keine sechsseitigen Tafeln, sondern Nadeln und ähnliche Krystallformen. Die optische Activität dieses Cystins war in den verschiedenen Fractionen wechselnd. Theils war es beträchtlich schwächer linksdrehend als das vorige, theils war es beinahe unwirksam, theils war es rechtsdrehend.

Bei der Beschreibung dieser Cystinpräparate nehme ich in erster Linie Bezug auf das optisch nur ganz schwach wirk-same Cystin (völlig unwirksam habe ich noch kein Präparat erhalten).

Die typische Krystallform dieses Cystins ist die von langen Nadeln oder langen, sehr schmalen zugespitzten Blättchen. Oft sind die Krystalle in Gruppen gesammelt. Diese Krystalle sind den Tyrosinkrystallen zum Verwechseln ähnlich. Bisweilen tritt das Cystin in Form von kleinen freien oder zu Gruppen vereinigten Stäbchen auf. Einmal habe ich beim Umkrystallisiren von Nadeln breite, dünne Blättchen erhalten, welche eine rhombische Form, vielleicht mit den spitzen Ecken abgeschnitten, zu haben schienen. Sie waren jedoch alle so innig in Gruppen vereinigt, dass die Form nicht gut zu sehen war. Nie habe ich von diesem Cystin ähnliche freie, sechsseitige Tafeln gesehen, wie sie bei dem stark linksdrehenden Cystin vorkommen.

Im Verhalten gegen Säuren und Alkalien habe ich keinen deutlichen Unterschied zwischen diesem Cystin und dem stark linksdrehenden beobachtet; die einzige Andeutung einer Verschiedenheit, welche ich gesehen habe, war die, dass das jetzt besprochene Cystin bei Zusatz von Essigsäure weniger leicht als das andere abgeschieden wurde.

In Wasser war das schwach drehende Cystin mehr löslich als das stark linksdrehende. In heissem Wasser war es mehr löslich als in kaltem.

Mit Natronlauge und Bleiacetat gab es Schwefelblei. Bei Behandlung mit Zinn und Salzsäure wurde Cystein gebildet, was an den Farbenreactionen zu erkennen war. Durch Oxydation desselben mit Jod wurde das Cystin in der ursprünglichen Form wiedergewonnen.

Die durch Kochen mit Wasser bereitete Lösung war ohne Einwirkung auf Lakmus. Gegen Reagentien verhielt sie sich hauptsächlich, wie ich oben (S. 603) für das stark linksdrehende Cystin angegeben habe, nur dass sie etwas reicher an Substanz zu sein schien und daher von einigen Reagentien etwas reichlicher gefällt wurde; daher wurde sie auch durch Merkuriacetat gefällt.

Da diese bleischwärende, in der Krystallform tyrosin-ähnliche Substanz mir zuerst etwas befremdend erschien, wurde sie in mehrere Fractionen getheilt und untersucht, um zu sehen, ob ein Gemenge von Cystin mit etwas Anderem vorlag: die Fractionen bestanden jedoch alle aus Cystin, nur mit wechselnder optischer Activität. Die ausgeführten näheren Untersuchungen werden unten mitgetheilt.

Die Präparate IV, V, VI und VII wurden in einem und demselben Versuche erhalten, wo die Hornsubstanz zwei Wochen mit der Salzsäure erhitzt wurde. Die Präparate VIII und IX wurden in einem anderen Versuche nach gleich langem Erhitzen gewonnen; in diesem Versuche ging die Hauptmasse des Cystins durch einen Unfall verloren, und diese Präparate wurden aus der Mutterlauge dargestellt. Ausserdem habe ich in einem Versuche nach Erhitzen während einer Woche, wobei hauptsächlich stark linksdrehendes Cystin in typischer Form erhalten wurde, auch eine geringe Menge von Cystin als Nadeln erhalten; dieses Präparat, das erste dieser Art, welches ich erhielt, war jedoch nicht rein (Schwefel = 25,37 % statt 26,68 %); es wurde zu Trennungsversuchen verbraucht.

Präparat IV bildete Kugeln von dünnen, schmalen, zugespitzten Blättchen.

Die Schwefelbestimmung in 0,1342 g gab 0,2598 g Baryumsulfat, was 26,70 % Schwefel entspricht.

Die volumetrische Bestimmung des Kohlenstoffs und Stickstoffs in 0,1098 g der Substanz gab (bei 0° C. und 760 mm.) 61,15 ccm. Kohlendioxyd und 9,91 ccm. Stickstoff, was 30,04 % Kohlenstoff und 11,36 % Stickstoff entspricht.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden 0,2550 g mit Salzsäure von 3 % gelöst und zu 15 ccm. aufgefüllt. Eine Schicht von 10 ccm. dieser Lösung drehte 0,095° nach links, was $[\alpha]_D = -5,6^\circ$ gibt.

Durch Reduction mit Zinn- und Salzsäure wurde Cystein dargestellt. Nach Entfernung des Zinns durch Schwefelwasserstoff, Abdampfen, Lösen in Weingeist und Abdampfen wurde das Cystein in Gruppen von rhombischen Tafeln erhalten. Das Cystein gab die charakteristische Blaufärbung mit Eisenchlorid. Die wässerige Lösung zeigte keine bemerkbare Einwirkung auf das polarisirte Licht. Nach spontaner Oxydation der Lösung in Natronlauge wurde aus ammoniakalischer Lösung krystallisirt und dabei neben amorphen Absätzen nadel förmige Krystalle erhalten.

Präparat V bildete Gruppen von Nadeln oder vielmehr sehr schmale zugespitzte Blättchen.

Die Bestimmung des Schwefels in 0,1630 g gab 0,3170 g Baryumsulfat oder 26,71 % Schwefel.

Die Verbrennung von 0,3490 g gab 0,3817 g Kohlendioxyd, 0,1621 g Wasser, was 29,80 % Kohlenstoff und 5,15 % Wasserstoff entspricht.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Wilfarth in 0,2596 g gab einen Verbrauch von 21,16 ccm. Zehntelnormalsäure, was 11,67 % Stickstoff entspricht.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurden 0,3089 g in 2 %iger Salzsäure bis zu einem Volumen von 40 ccm. gelöst. In einer Schicht von 30 ccm. drehte diese Lösung 0,13° nach links. Dies gibt ein Drehungsvermögen von $[\alpha]_D = -5,5^\circ$.

Die Löslichkeit in Wasser bei 17° C. wurde auf 1 : 4000 bestimmt.

Die jetzt besprochenen Präparate waren allerdings nicht völlig inactiv. Im Vergleich zu dem Drehungsvermögen des gewöhnlichen, stark linksdrehenden Cystins war ihre optische Activität so gering, dass sie als aus dem entsprechenden optisch inactiven Cystin bestehend betrachtet werden können, vorausgesetzt, dass sie mit dem linksdrehenden Cystin stereoisomer und nicht structurisomer sind. Zur Beleuchtung dieser Frage und zur Kenntniss des in Nadeln krystallisirenden Cystins sind die folgenden Präparate von Interesse, da sie ähnliche Krystallform wie dieses schwachdrehende (inactive) Cystin hatten,

jedoch eine ziemlich bedeutende Activität mit wechselndem Vorzeichen aufwiesen und deshalb Glieder zwischen diesem und einerseits dem stark linksdrehenden Cystin, wie andererseits dem noch nicht dargestellten, ebenso stark rechtsdrehenden Cystin darstellen.

Präparat VI wurde in demselben Versuche wie IV und V erhalten, und zwar in grösserer Menge als diese. Zuerst wurde es in der Form von tyrosinähnlichen Nadeln erhalten, neben welchen sich einzelne krystallinische Kugeln vorfanden. Bei der Umkrystallisation wurde es homogen und zeigte sehr kleine, kurze Stäbchen.

Die Schwefelbestimmung in 0,1831 g gab 0,3574 g Baryumsulfat, was 26,80 % Schwefel entspricht.

Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Wilfarth in 0,2392 g wurden 19,9 ccm. Zehntelnormalsäure verbraucht, was 11,66 % Stickstoff entspricht.

Zur Bestimmung der optischen Activität wurden 0,5134 g in 2 % iger Salzsäure gelöst und zu 28 ccm. aufgefüllt. In einer Schicht von 20 ccm. drehte diese Lösung 2,43° nach links, was $(\alpha)_D = -66^\circ$ entspricht.

Die Bestimmung der Löslichkeit in Wasser bei 17° C gab den Werth 1 : 3000.

Präparat VII. Die Mutterlauge beim Umkrystallisiren des vorigen Präparates wurde weiter abgedampft, wobei eine geringe Menge von Kugeln mit undeutlich krystallinischem Bau erhalten wurde. Zur Bestimmung der optischen Activität reichten dieselben nicht hin. Sie wurden zu einer Schwefelbestimmung verwendet und dadurch als Cystin identificirt.

Aus 0,0810 g der Substanz wurden 0,1584 g Baryumsulfat erhalten, was 26,62 % Schwefel entspricht.

Präparat VIII bestand aus langen, wohl ausgebildeten Nadeln, welche meistens frei waren; bisweilen waren sie jedoch zu Gruppen vereinigt.

Die Schwefelbestimmung in 0,1612 g gab 0,3121 g Baryumsulfat, was 26,58 % Schwefel entspricht.

Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Wilfarth wurden für 0,2028 g der Substanz 17,0 ccm. Zehntelnormalsäure gebunden, was 11,74 % Stickstoff entspricht.

Zur Bestimmung der optischen Activität wurden 0,0541 g in Salzsäure (von 2 %) gelöst und bis 28 ccm. aufgefüllt. In einer Schicht von 20 ccm. bewirkte diese Lösung eine Drehung von 0,18° nach rechts, was $(\alpha)_D = +47^\circ$ entspricht.

Die bei 17° C bereitete wässrige Lösung war noch stärker rechtsdrehend. Mit einem Gehalte von 0,346 g im Liter drehte eine Schicht von 20 ccm. 0,065° nach rechts. Dies gibt $(\alpha)_D = +93^\circ$. Dies kann

dadurch erklärt werden, dass beim Schütteln von einem Ueberschuss des nicht einheitlichen Präparates mit Wasser vorwiegend rechtsdrehendes Cystin ausgelöst wurde.

Die Bestimmung der Löslichkeit in Wasser bei 17° C gab den Werth 1 : 3000.

Präparat IX. Aus der Mutterlauge vom vorigen Präparate wurden durch weiteres Abdampfen im Vacuum Krystallnadeln erhalten, welche fast völlig rein waren. Sie sind deshalb von Interesse, weil auch sie rechtsdrehend waren, obgleich in geringerem Grade.

Bei der Schwefelbestimmung wurden aus 0,0937 g der Substanz 0,1791 g Baryumsulfat erhalten, was 26,25% Schwefel entspricht.

Zur Bestimmung der optischen Activität wurden 0,1254 g in 2% iger Salzsäure gelöst. Das Volumen der Lösung war 28 ccm. Eine Schicht von 20 ccm. dieser Lösung drehte 0,14° nach rechts, was $(\alpha)_D = +16^\circ$ gibt. Da die Muttersubstanz überwiegend rechtsdrehendes Cystin enthielt, erwartete ich, dass dieses verhältnissmässig reichlicher in der Mutterlauge zurückbleibe; dies war aber nicht der Fall.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen des nadelförmig krystallisirenden Cystins werden in der folgenden Tabelle mitgetheilt.

	Cystin be- rechnet %	Präpa- rat IV %	Präpa- rat V %	Präpa- rat VI %	Präpa- rat VII %	Präpa- rat VIII %	Präpa- rat IX %
Schwefel	26,68	26,70	26,71	26,80	26,62	26,58	26,25
Stickstoff	11,69	11,36	11,67	11,66	—	11,74	—
Kohlenstoff	29,96	30,04	29,80	30,23	—	—	—
Wasserstoff	5,04	—	5,15	5,22	—	—	—
$(\alpha)_D$	—	—5,6°	—5,5°	—66°	—	+47°	+16°
Löslichkeit	—	—	1:4000	1:3000	—	1:2900	—

Wie ersichtlich, war die Zusammensetzung aller Präparate die des Cystins.

Für die Annahme, dass es ein mit dem gewöhnlichen Cystin structurisomeres Cystin war, etwa von β -Thiomilchsäure derivirt, liegt kein Grund vor. Die Uebereinstimmung mit dem linksdrehenden Cystin im Verhalten zu Reagentien befindet sich im Widerspruch zu dieser Annahme.

Alles spricht für die Annahme einer Stereoisomerie.

Wo die Erhitzung mit Salzsäure nur eine Woche dauerte, erhielt ich überwiegend das typische, in sechsseitigen Tafeln krystallisirende Cystin und eine geringere Menge des in Nadeln krystallisirenden Cystins. Bei längerem Erhitzen wurde eine reichlichere Menge Cystin erhalten, aber ausschliesslich von der letzterwähnten Form und viel schwächer linksdrehend, fast inactiv oder sogar rechtsdrehend. Dies spricht dafür, dass nach der Bildung des linksdrehenden Cystins rechtsdrehendes Cystin entsteht, entweder durch Umlagerung innerhalb des linksdrehenden Cystins, oder durch eine spätere Abspaltung aus dem Keratinmoleküle.

Die Präparate IV und V bestanden also aus fast gleichen Mengen des linksdrehenden und des rechtsdrehenden Cystins. Das Präparat VI enthielt überwiegend linksdrehendes und die Präparate VIII und IX überwiegend rechtsdrehendes Cystin.

Ob das inactive Cystin nur ein Gemenge der beiden activen Cystine, ob es eine racemische Form war, oder ob die Drehung durch innere Compensation aufgehoben wurde, lasse ich bis auf Weiteres dahingestellt und hoffe durch fortgesetzte Untersuchungen dies ermitteln zu können.

Das rechtsdrehende Cystin, welches dem seit lange bekannten linksdrehenden Cystin entspricht, ist noch nicht rein dargestellt worden. Aus den oben angeführten Löslichkeitsziffern kann man schliessen, dass es wahrscheinlich viel löslicher als dieses ist.

Ausser der Entstehung von Cystin bei der hydrolytischen Spaltung der Hornsubstanz habe ich dabei auch die Bildung von Cystein beobachtet.

Nachdem die Hauptmasse des Cystins durch Bleioxyd abgeschieden war, wurde das gelöste Blei, wie auch gegenwärtiges Eisen, in der Form von Schwefelmetallen abgeschieden, die Lösung bei neutraler oder schwachsaurer Reaction im Vacuum abdestillirt und im Vacuumexsiccator stehen gelassen. Der dabei nebst Amidosäuren ausgeschiedene Rest von Cystin wurde abfiltrirt. Das Filtrat gab die Farbenreactionen des Cysteins, wenn auch nicht rein.

Das Cystein gibt beim Erhitzen mit Bleiacetat und Natronlauge Schwefelblei (wie das Cystin) und zeigt übrigens folgende Farbenreactionen, welche man mit dem aus Cystin dargestellten reinen Cystein sehr schön erhalten kann.

Mit Eisenchlorid gibt die Lösung eine schön indigblaue Farbe, welche fast augenblicklich verschwindet.¹⁾ Mit Kupfersulfat gibt das Cystein nach Suter²⁾ eine vorübergehende Violettfärbung und dann einen grauen Niederschlag. Bei Zusatz von Nitroprussidalkali und Natronlauge tritt auch in sehr verdünnter Lösung eine starke purpurrothe Färbung auf, welche bald abbleicht, indem sie in Rothbraun übergeht und dann verschwindet. Wenn Essigsäure im ersten Stadium zugesetzt wird, tritt keine Blaufärbung auf (wie bei Indol und Thormählens Harnreaction). Wenn Essigsäure zugesetzt wird, nachdem die rothe Farbe verschwunden ist, und dann gekocht wird, tritt blaue Farbe (Berlinerblau) auf. Zu diesen Reactionen verhält sich dagegen das Cystin negativ.³⁾

Aus der oben erwähnten Mutterlauge konnte die Substanz, welche diese Reactionen gab, zum Theil durch Kupferacetat (unter Vermeidung eines Ueberschusses) gefällt werden; nach Zersetzen des Niederschlages durch Schwefelwasserstoff und Einkochen im Vacuum wurden die erwähnten Reactionen sehr schön erhalten. Aus dem Abdampfrückstand setzten sich im Vacuumexsiccator Gruppen von Nadeln und dünnen Blättchen ziemlich reichlich ab. Die Krystalle waren aber allzu leicht löslich, um sie in dieser Weise rein zu erhalten. Ich habe es deshalb vorgezogen, durch Zusatz von Jod, so lange die Farbe desselben verschwand, zu oxydiren. Dies wurde auch, aber weniger vortheilhaft, mit Eisenchlorid ausgeführt. Das gebildete Cystin konnte dann leicht durch Krystallisation aus ammoniakalischer Lösung isolirt und gereinigt werden.

¹⁾ Baumann, Diese Zeitschrift, Bd. VIII, 1884, S. 301.

²⁾ Suter, Diese Zeitschrift, Bd. XX, 1895, S. 575.

³⁾ Da Hemala (Maly, Jahrb. d. Thierchemie, Bd. 19, S. 89) angibt, dass Cystin die Nitroprussidreaction gebe, beruht dies, wie der Referent bemerkt, auf einem Irrthum.

Aus dem Filtrate von der Kupferacetatfällung konnten weitere Portionen der Substanz, welche die Cysteinreactionen gab, durch Zusatz von Quecksilberchlorid und von Mercuriacetat, unter Abstumpfung der sauren Reaction durch Natronlauge, gefällt werden. Nach Zersetzen der Niederschläge durch Schwefelwasserstoff und Eindampfen wurden auch hier Cysteinreactionen erhalten. Nach der Oxydation konnte Cystin dargestellt werden und wurde durch Abspaltbarkeit von Schwefel und durch die Analyse identificirt.

Bei der Ausfällung der Quecksilberverbindungen schien eine reichlichere Menge anderer Substanzen ausgefällt zu werden, als es bei der Fällung mit Kupferacetat der Fall war. Durch Ausfällen der Quecksilberverbindungen konnte ich die bleischwärende Substanz fast vollständig aus der Lösung entfernen, so dass nach Entfernung des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff und Einkochen im Vacuum kaum eine Bildung von Schwefelblei beim Erhitzen mit Bleiacetat und Natronlauge beobachtet wurde.

Ich theile im Folgenden die Analyse der nach Oxydation dargestellten Cystinpräparate mit:

Präparat X, aus der Kupferacetatfällung dargestellt. Es bestand aus sehr kleinen Stäbchen von demselben Aussehen wie Präparat VI.

Die Schwefelbestimmung in 0,1641 g der Substanz gab 0,3187 g Baryumsulfat, was 26,67% Schwefel entspricht.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Wilfarth zeigte für 0,1814 g Substanz einen Verbrauch von 15,1 ccm. Zehntelnormalsäure, was 11,69% Stickstoff entspricht.

Präparat XI, aus der Kupferacetatfällung. Es bildete kleine, zugespitzte Blättchen, welche hauptsächlich frei lagen.

Die Schwefelbestimmung in 0,0907 g gab 0,1761 g Baryumsulfat, was 26,66% Schwefel entspricht.

Präparat XII, aus dem Filtrate von der Kupferacetatfällung des vorigen Präparates, durch Fällen mit Quecksilberchlorid und mit Mercuriacetat und Bearbeitung dieser Niederschläge dargestellt; die Oxydation wurde mit Eisenchlorid bewerkstelligt. Es bestand theils aus gut ausgebildeten sechsseitigen Täfelchen und theils aus Nadeln. Manchmal waren Krystalle beider Formen vereinigt, als ob eine Nadel durch die Mitte eines sechsseitigen Täfelchens gestochen wäre. Ausserdem kamen Kugeln mit undeutlich krystallinischem Bau vor.

Die Schwefelbestimmung in 0,1392 g gab 0,2695 g Baryumsulfat, was 26,58 % Schwefel entspricht.

Die folgende Tabelle gibt die Analysen des aus Cystein dargestellten Cystins wieder.

	Cystin Berechnet	Präparat X	Präparat XI	Präparat XII
Schwefel	26,68 %	26,67 %	26,66 %	26,58 %
Stickstoff	11,69 %	11,69 %		

Dass die Präparate X, XI, XII aus Cystin bestanden, ist aus den Analysen und ihren Eigenschaften im Uebrigen sichergestellt. Da dieses Cystin durch Oxydation einer Substanz entstanden ist, welche die qualitativen Eigenschaften des Cysteins zeigte, ist man völlig berechtigt, zu schliessen, dass Cystein vorlag, obgleich es nicht als solches isolirt wurde.

Aus den oben mitgetheilten Untersuchungen geht hervor, dass man durch hydrolytische Spaltung der Hornsubstanz bei der Einwirkung von Salzsäure Cystin in beträchtlicher Menge darstellen kann. Das Cystin wird theils als typisches linksdrehendes Cystin in den bekannten sechsseitigen Tafeln erhalten, theils in anderer Krystallform (wie Nadeln) und mit anderer optischer Activität erhalten. Neben Cystin kann eine geringe Menge Cystein auftreten.

Man kann daher sagen, dass sich in der Hornsubstanz gewissermassen eine Cystingruppe präformirt vorfindet, oder jedenfalls eine Atomgruppe, welche leicht in Cystin übergeht. Ueber den näheren Bau und über die Verkettung derselben wage ich jetzt keine Ansicht auszusprechen.

Die weitere Verfolgung dieser Untersuchungen und deren Ausdehnung auf andere Proteinstoffe, die bleischwärenden Schwefel bei der Einwirkung von Lauge abspalten, behalte ich mir vor. Ich will indes schon jetzt einige Punkte berühren.

Bei der Spaltung der Hornsubstanz scheint Bildung von Cystin der Entstehung von Cystein vorauszugehen. Soviel ich bisher gesehen habe, tritt das Cystein nicht nach einwöchentlicher Erhitzung, sondern erst später auf. Auch wenn die Luft in dem Erhitzungskolben durch Wasserstoff verdrängt wurde, trat Cystin und nur wenig Cystein auf. Ich schliesse

aus diesen Beobachtungen, dass Cystin das Primäre ist, und dass Cystein durch Reduction daraus gebildet wird. Eine andere Frage, die ich schon jetzt berühren will, ist die, ob das Cystin (nebst dem Cystein) der ganzen Menge von bleischwärendem Schwefel in der Hornsubstanz entspricht. Bis jetzt habe ich keine andere Substanz isoliren können, welche bleischwärenden Schwefel enthält.

Die Menge des bisher isolirten Cystins entspricht jedoch nicht der ganzen Menge des bleischwärenden Schwefels, welche sich in der Hornsubstanz vorfindet.

In einem Theil der getrockneten Hornspäne wurde der Gesamtschwefel auf 3,42% bestimmt. Darin machte der als Schwefelblei abspaltbare Schwefel die Hauptmasse aus. Eine Bestimmung desselben durch Kochen mit Natronlauge unter Zusatz von Zink nach der Vorschrift von Schulz¹⁾ und Bestimmung des Schwefels in dem abgeschiedenen Schwefelmetall gab den Werth 2,53% Schwefel.

Wenn die ganze Menge des als Schwefelblei abspaltbaren Schwefels von der Cystingruppe der Hornsubstanz stammte, und wenn dieses Cystin nicht mehr Schwefel in der Form von Schwefelblei abgäbe als das freie Cystin, würde der ganze Schwefelgehalt der Hornsubstanz (3,42%) der Cystingruppe angehören, da nämlich das freie Cystin bei Weitem nicht die ganze Menge seines Schwefels als Schwefelblei abgibt. Unter dieser Annahme wäre es unberechtigt, von mehr als einer Bindungsweise des Schwefels zu sprechen.

Wenn man annimmt, dass die in der Hornsubstanz gebundene Cystingruppe den Schwefel leichter und vollständiger abgibt, so dass aller Schwefel als Schwefelblei auftritt, so würde, wenn Cystin die einzige bleischwärende Gruppe wäre, der Gehalt von 2,53% bleischwärenden Schwefels einer Cystinmenge von $9\frac{1}{2}\%$ der Hornsubstanz entsprechen. So viel Cystin habe ich keineswegs darstellen können. Die grösste Menge Cystin (das aus Cystein erhaltene mitgerechnet), welche ich bisher erhalten habe, war rund 11 g reines oder fast reines

1) N. Schulz, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, 1898, S. 20.

Cystin aus 450 g trockener Hornsubstanz, d. h. etwa $2\frac{1}{2}\%$ des Gewichts derselben. Dies ist höchstens ein Viertel von der Menge, welche denkbar ist, wenn Cystin die einzige bleischwärende Substanz des Keratins ist. Es ist zwar möglich, dass ich bei der Darstellung drei Viertel des Cystins verloren habe; ich kann dies natürlich nicht leugnen, da es unmöglich ist, zu sagen, wieviel Cystin zersetzt wird und wieviel in den Mutterlaugen verloren geht. Vorläufig scheint es mir jedoch mehr wahrscheinlich, dass die Hornsubstanz ausser dem Cystin noch eine andere bleischwärende Substanz enthält. Bisher habe ich zwar noch keine solche isoliren können; doch werde ich bei den fortgesetzten Untersuchungen auch diese Frage berücksichtigen.

Stockholm, im September 1899.

Nachtrag.

Nachdem das Manuscript schon zum Drucke geliefert war, habe ich durch Verbesserung der Darstellungsmethode eine noch bessere Ausbeute an Cystin erhalten. Aus 360 g trockener Hornsubstanz erhielt ich, nach einwöchentlicher Erhitzung mit der Salzsäure, 16,1 g reines Cystin, d. h. $4\frac{1}{2}\%$ der Hornsubstanz. Dieses Cystin bestand zu etwa $\frac{3}{4}$ aus Linkscystin; es hatte jedoch keine Neigung, als sechsseitige Täfelchen zu krystallisiren.

Bei fortgesetztem Erhitzen fand keine weitere Abspaltung von Cystin statt.

In diesem Versuche wurde keine Bildung von Cystein beobachtet.

Druck von M. DuMont-Schauberg, Strassburg i. E.

Druckfehler-Berichtigung.

Seite 387 Zeile 1 von oben lies „a“ statt „b“.

Seite 387 Zeile 1 von unten lies „parallel“ statt „11“.



